



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Abbés Laghrou* Khenchela*
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie moléculaire et cellulaire

Spécialité : Micro biologie appliqué

Thème

Isolement et dénombrement des *Rhizobia* nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

Présenté par :

TAAYAT Naima

MENADI Souria

Soutenu le : 04/07/2017

Devant le jury :

Président	Mr. Zeraib	A.M.C.B	Université Abbes Laghrou –Khenchela
Examineur	M ^{elle} . Boutarfa	S.M.A.A	Université Abbes Laghrou –Khenchela
Encadreur	Mr. Salhi	Z. M.A.A	Université Abbes Laghrou –Khenchela
Invité	Mr. Bousaa	A. M.A.A	Université Abbes Laghrou –Khenchela

Promotion 2016/2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

*Avant tout nous remercions **Dieu** le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

Un grand merci aux membres du jury :

Mr. Zeraib A et Me^{lle}. Boutarfa

*Nous tenons à remercier très chaleureusement notre plus profonde gratitude, notre plus grand respect a **Mr. Salhi Z.** qui nous a assistées et guidées, nous vous remercions d'avoir été toujours présent et nous avoir suivis régulièrement pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces encouragements.*

*Nous présentons notre plus grand respect Madame **Chorfi Rafika** Responsable de laboratoire de recherche pour l'occasion qu'elle nous a donnée afin de réaliser ce travail dans laboratoire*

*D'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail
Nous remercions toute l'équipe de laboratoire sans exception surtout madame **Souad** pour son aide et sa gentillesse*

Un grand merci a tous.

Merci



Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes parents Fatima Zohra et Moustafa pour leur
encouragement*

Qui ont toujours cru en moi

*Et su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au
rendez-vous.*

A mes belles sœurs : Noura et warda

A mon frères : Yousef et Chiheb Eddine

Mourad et Fateh

A toutes mes amies

...

NAIMA T.





Dédicace

A ma mère SALIHA et mon père MOHAMED qui m'a soutenu et encouragé dans tous les domaines et surtout pour

Réaliser ce mémoire

A mes chers frères Imad, Harroun, Khalil et sœurs Meriem, Takwa

A toute la famille Menadi, Reddah

A mes cousins et mes cousines

A toutes mes amies

...

SOURIA M.



Table de matière

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des photographies	III
Liste des abréviations	IV
Résumé	V
Introduction générale	01

Première partie : Etude bibliographique**Chapitre I : les légumineuses**

1	Généralité	03
1.1	Les légumineuses	03
1.2	Rôle des légumineuses dans la pollution par les nitrates	03
2	Le pois chiche« <i>Cicer arietinum L.</i> »	04
2.1	Origine	04
2.2	Définition du pois chiche	04
2.3	Classification botanique du <i>Cicer arietinum L.</i>	04
2.4	Morphologie de la plante	04
2.5	La Composition moyenne du pois chiche	05
2.6	Les types cultivars	06
2.6.1	Le type Kabuli	06
2.6.2	Le type Desi	06
2.6.3	Le type gulabi	06
2.7	Type de culture	06
2.8	Les différentes étapes de développement du pois chiche	07
2.8.1	Phase végétative	07
2.8.2	Phase reproductrice	07
2.9	L'exigence de pois chiche	07
2.9.1	La température	07
2.9.2	L'eau	08
2.9.3	Le sol	08
2.10	Situation de la culture du pois chiche	08
2.10.1	Dans le monde	08
2.10.2	En Algérie	08
2.11	Variétés cultivées en Algérie	09
2.12	Les maladies affectant le pois chiche	09
2.12.1	Anthracnose (<i>Ascochyalarabiel</i>)	09
2.12.2	Flétrissement ou wilt	10
2.12.3	Le Stunt : Rabogrissement	10
2.12.4	La noctuelle	10
2.12.5	Diptère	10
2.13	Lutte contre les maladies	10
2.14	Utilisation du pois chiche	11
2.15	Utilisation médicinales traditionnelles	11

Chapitre II : Notion *Rhizobium*

1	Notion de <i>Rhizobium</i>	12
2	Taxonomie	12
3	Génétique de la fixation	14
4	Phénomène de la Nodulation	14

4.1	Formation des bactéroïdes	14
5	Mécanisme de la nodulation	15
5.1	Définition de nodule	15
5.2	Structure et morphologie des nodules	15
5.3	Formation des nodosités	16
6	Inoculation et compétition entre souches	18
Chapitre III : Relation symbiotique légumineuse-<i>Rhizobium</i>		
1	La symbiose	20
2	La fixation d'azote	20
2.1	L'azote	20
2-2	Le cycle de l'Azote	20
2.3	La fixation d'azote	22
2.3 .1	La fixation physique	22
2.3.2	La fixation biologique	22
2.4	La nitrogénase et son fonctionnement dans la fixation de l'azote	23
2.5	La leghémoglobine	24
2.6	L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes	24
3	La spécificité symbiotique	25
Chapitre IV : Les métabolites secondaires		
1	Généralité	26
2	Les polyphénols	26
2.1	Définition	26
2.2	Biosynthèse des composés phénoliques	26
2.2.1	La voie de Shikimate	26
2.2.2	La voie des phénylpropanoïdes	27
1	Les flavonoïdes	27
3.1	Définition	27
3.2	Structure chimique et classification des flavonoïdes	27
3.3	Les principales classes et structures de flavonoïdes	28
3.4	Localisation et distribution	28
3.5	Biosynthèse des flavonoïdes	29
3.6	Activité antimicrobienne des flavonoïdes	29
3.7	Autres activités des flavonoïdes	30
Deuxième partie : Etude expérimentale		
I Dispositif expérimental		
1	Site	31
2	Station pépinière de Kais	31
3	Caractéristiques des variétés de pois chiche étudiés	31
II Isolement et caractérisation du <i>Rhizobium</i>		
1	Isolement des bactéries à partir des nodules	33
1.1	Collecte des nodules	33
1.2	Conservation des nodules	33
1.3	Stérilisation des nodules	34
1.4	L'écrasement des nodules	35
1.5	Observation des colonies	35

1.6	Repiquage des souches bacteriennes	36
2	Dilutions décimales	37
3	Dénombrement des souches bactériennes	37
III Dosage et extraction des flavonoïdes		
1	Matériel végétal	38
2	Extraction des flavonoïdes	39
3	Dosage des flavonoïdes	39
4	Lecture par spectrophotométrie	40
IV Résultats et discussion		
1	Observation des colonies	41
2	Observation des isolats de la dilution décimale	41
3	Dénombrement des souches bactériennes	42
4	Repiquage des souches bacteriennes	43
5	Teneur en flavonoïdes des différentes variétés de pois chiche	43
6	Teneur en flavonoïdes au niveau des racines et des feuilles	44
7	Teneur en flavonoïdes durant les stades de développement	46
8	Etude statistique	48
	Conclusion	49
	Références bibliographiques	50
	Annexe	

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 01	Superficie des légumineuses alimentaires en Algérie	01
Figure 02	Le pois chiche (<i>Cicer aietinum</i> L.)	03
Figure 03	Les types de cultivars de pois chiche	04
Figure 04	Cycle phénologique du pois chiche	05
Figure 05	Evolution des superficies, des productions et des rendements du pois chiche durant la période 1961 -2010 en Algérie	07
Figure 06	Morphologie de <i>Rhizobium trifolii</i>	10
Figure 07	Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose <i>Rhizobium</i> / légumineuse Nod- dépendant d'après	12
Figure 08	Infection intracellulaire et différenciation du Symbiosome chez les légumineuses	13
Figure 09	Schéma de la nodulation Etape 1	14
Figure 10	Schéma de la nodulation Etape 2	15
Figure 11	Schéma de la nodulation Etape 3	15
Figure 12	Coupe longitudinale de racine montrant un nodule fonctionnel	16
Figure 13	Le cycle de l'azote	19
Figure 14	Des échanges réciproques de nutriments entre la plante et le <i>rhizobium</i> hébergé et transformé en bactéroïde dans le nodule	20
Figure 15	La structure de base d'un flavonoïde	25
Figure 16	Les principales classes et structures de flavonoïdes	26
Figure 17	Courbe d'étalonnage de la quercitine.	40
Figure 18	Teneur en flavonoïdes des 04 variétés de pois chiche étudiées.	43
Figure 19	Teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et des racines des 04 variétés de pois chiche étudiées.	44
Figure 20	Teneur en flavonoïdes durant les différents stades de développement des 04 variétés de pois chiche étudiées.	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Les principales variétés cultivées en Algérie	09
Tableau 02	Classification des <i>Rhizobiacée</i>	13
Tableau 03	Estimation des apports de produits azotés réactifs dans la biosphère (10 ⁶ tn/an) d'après <i>Schlessinger (2009)</i>	23
Tableau 04	Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes	29
Tableau 05	Origines et caractéristiques des variétés de pois chiche étudiées	32
Tableau 06	Dénombrement des souches bactériennes après dilutions décimales des 04 variétés de <i>cicer arietinum L.</i>	42
Tableau 07	Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables	48

Liste des photographies

Photographie	Titre	Page
Photographie 01	Les 04 variétés du pois chiche étudiées	31
Photographie 02	Nodules de la plante hôte (<i>Cicer arietinum L.</i>)	33
Photographie 03	Les nodules du <i>cicer arietinum L.</i>	33
Photographie 04	Les nodules conservés sous CaCl ₂	34
Photographie 05	Les étapes de stérilisation des nodules	34
Photographie 06	Les nodules stériles écrasés dans une goutte d'eau distillée	35
Photographie 07	L'ensemencement selon la technique des quatre cadrans	35
Photographie 08	L'observation des colonies après incubation de 30°C	35
Photographie 09	Repiquage des isolats	36
Photographie 10	Récolte, séchage des 04 variétés du pois chiche durant les 04 phases de développement	37
Photographie 11	Extraction et filtration du solvant sur papier filtre	38
Photographie 12	Dosage et lecture par spectrophotomètre des flavonoïdes	39
Photographie 13	L'observation des colonies après incubation à 30°C	41
Photographie 14	Observation des isolats de dilution décimale.	41
Photographie 15	Repiquage des souches bactériennes	43

Liste des abréviations

AlCl₃	Chlorure d'aluminium
BNF	Biological nitrogen fixation
Ca Cl₂	Chlorure de Calcium
CHI	Chalcone Isomérase
CHS	Chalcone synthase
DO	Densité Optique
EQ	Equivalent Quercétine
F₃H	Flavanone-3-Hydroxylase
FAO	Food Agronomic Organisation
FLS	Flavonol Synthase
Hg Cl₂	Chlorure de mercure
ITGC	Institut Technique des Grandes Cultures
Leghb	Leghémoglobine
NaCl	Chlorure de sodium
NaNO₂	Nitrite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH₃	Azote ammoniacal
NH⁴⁺	Ions ammonium
NO³⁻	Nitrate
Nod	Nodulation
ONM	office notionnel méthiologie
pH	potentiel Hydrogène
Phe	Phénylalanine
PMG	Poids de mille graines
UFC	Unité Formant de Colonies
USDA	United States Departement of Agriculture
YMA	Yeast mannitol agar

Résumé

Résumé

Cette étude porte sur une expérimentation faite sur 04 variétés de pois chiche **GAB40**, **ILC 32-79**, **FLIP 85-55**, **FLIP 84-92** cultivé au niveau de la pépinière de Kais wilaya de Khenchla, cette étude a montré que des teneurs en polyphénols (Flavonoïdes) sont très importantes au niveau des racines des 04 variétés durant les 02 phases de développement de la plante (Formation et remplissage des gousses). Surtout pour les 02 variétés **GAB 40** et **ILC 32-79** (Activité symbiotique).

L'isolement des bactéries du genre *Rhizobium* nodulant les 04 variétés du pois chiche peuvent être identifiés et caractérisés pour l'inoculation du pois chiche par les souches bactérienne donnant un meilleur rendement agricole et permettant de réduire l'utilisation des fertilisants azotés et le recyclage de l'azote dans les sols agricoles.

Mots clés : Pois chiche, *Rhizobium*, Isolement, Flavonoïde.

Introducción

Introduction générale

Les légumineuses alimentaires font partie de l'alimentation traditionnelle et constituent la principale source de protéines disponibles localement dans les pays en voie de développement en outre l'Algérie. Elles sont présentes dans nos systèmes agraires associés aux céréales contribuant à la fertilité des sols et à l'amélioration de leurs structures. Depuis la restructuration du système agricole et sa libéralisation, ces cultures ont connus des perturbations arbitraires dont les conséquences se caractérisant par une régression des superficies, une fluctuation de la productivité et de la production qui demeure très insuffisante pour répondre aux besoins et une marginalisation accentuée par le manque de soutien et d'encouragement à ce secteur. Parallèlement à cela, on constate une augmentation très marquée des importations pour assurer la couverture des besoins de consommation et en semences engendrant ainsi une dépendance alimentaire de plus en plus accentuée vis-à-vis de l'extérieur.

Le Pois chiche d'où le nom scientifique «*Cicer arietinum L.*» présente l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *Rhizobiums*. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie.

L'importance de la relation symbiotique entre ces légumineuses et le *Rhizobium* réside dans la fixation de l'azote atmosphérique et l'enrichissement du sol par l'azote pour améliorer ces caractéristiques, il est indispensable de trouver les moyens nécessaires et les techniques adéquates pour améliorer la production des légumineuses et faire augmenter le rendement des récoltes en favorisant le développement des bactéries du sol pour l'enrichir en azote.

La culture du pois chiche présente un avantage considérable de part sa capacité de fixer l'azote atmosphérique dans le sol, son adaptation aux différents climats difficile, grâce à son système racinaire très développés qui lui confère une place importante en agriculture. Le pois chiche est capable de s'associer avec des bactéries du sol pour former de nouvelles structures racinaires à l'intérieur desquelles l'azote atmosphérique est réduit en ammonium. Cette association est très spécifique et seul un groupe particulier de *Rhizobium* peut induire la formation de nodosités et fixatrices d'azote.

Il s'avère selon la bibliographie que l'activité symbiotique entre *Rhizobia* et le pois chiche «*Cicer arietinum L.*» est géré par un signal chimique dont les flavonoïdes jouent un rôle majeur.

La question principale qu'on se pose actuellement est la suivante : Qu'elle est l'impact des métabolites secondaires en particulier sur l'interaction *Rhizobia*-Pois chiche et indirectement sur la fixation d'azote et les rendements ?

Notre étude se compose de trois parties essentielles : La première partie est une étude bibliographique sur les légumineuses en générale et le pois chiche en particulier, et les interactions *Rhizobium*-légumineuses.

La seconde partie est consacrée au travail expérimental notamment l'identification et la caractérisation des souches du genre *Rhizobia* nodulant quatre variétés de pois chiche

(GAB 40, ILC 32-79, FLIP 84 et FLIP 85) par l'isolement des souches de *Rhizobium* pour mettre en évidence la relation symbiotique pois chiche/ rhizobium ainsi que la souche la plus importante d'un point de vue rendement agricole.

La troisième partie va être consacrée à l'analyse des résultats quantitatifs et qualitatifs obtenus du dosage et l'extraction des métabolites secondaires « les flavonoïdes » en particulier durant les quatre phases du développement et la croissance du pois chiche «*Cicer arietinum L.*» il s'agit des stades de ramification, floraison, formation des gousses, remplissage des gousses et maturation, et la corrélation entre les flavonoïdes les stades de croissance pour chacune des variétés du pois chiche étudiés.

Enfin la dernière phase une analyse statistique des résultats obtenus et la corrélation multicritères des différentes composantes de notre étude.

Première partie

Etude bibliographique

Chapitre I
Généralités sur les
légumineuses

1 Généralités

1.1 Les légumineuses

Les légumineuses demeurent une production nationale stratégique dans le contexte actuel de mise au point de modes de production agricoles plus économiques énergétiquement et plus respectueuses des contraintes environnementales (**Thiébeau et al., 2011**).

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, et *Papilionoideae*, et compte environ 20.000 espèces (**Gepts et al., 2005**).

Les légumineuses présentent l'énorme avantage, par rapport aux autres plantes, de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *Rhizobiums* (**Lerouge et al., 1990**).

En plus de leur importance dans le régime alimentaire des êtres humains, elles ont un intérêt particulier dans le concept d'agriculture durable dans la mesure où leur introduction dans l'assolement instaure la rotation des cultures, la diversification des productions et la protection de l'environnement par l'économie des engrais azotés et des désherbants chimiques (**Kramer, 1983**).

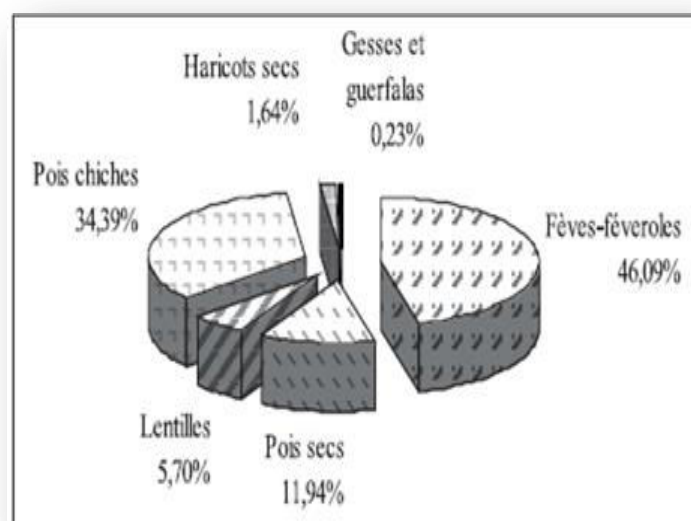


Figure 01: Superficie des légumineuses alimentaires en Algérie (**Labdi et al., 1990**).

1.2 Rôle des légumineuses dans la pollution par les nitrates

Les nitrates peuvent être des polluants lorsqu'ils atteignent les nappes d'eaux souterraines et les cours d'eau (**Jean, 1973**).

Les légumineuses en croissance ne sont généralement pas des sources importantes de nitrates dans les eaux de drainage. Au contraire, ce sont des plantes qui, bien qu'elles fixent

l'azote de l'air par son association avec les *Rhizobiums*, permettent de réduire la quantité de nitrates lessivés dans le profil car elles utilisent très bien les nitrates résiduels. Lorsqu'elles croissent dans un milieu riche en azote, elles fixent simplement moins d'azote de l'air (Jean, 1973).

2 Le pois chiche «*Cicer arietinum L.*»

2.1 Origine

Van Der Measen (1972) a cru que les espèces proviennent du Caucase méridional et de la Perse Nordique. Cependant, Ladizinsky (1975) a rapporté que le centre d'origine était la Turquie du Sud-est.

Van Der Measen (1987) a identifié la région du Sud-est de la Turquie touchant la Syrie comme centre possible d'origine du pois chiche basée sur la présence des espèces annuelles étroitement liées.

2.2 Définition du pois chiche

Pois chiches (*Cicer arietinum L.*) est une légumineuse importante Cultures vivrières dans de nombreux pays en développement (Singleton, Ben Bohlool, 1984).

2.3 Classification botanique du *Cicer arietinum*

Règne : *Plantae*.

Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires).

Embranchement : *Spermatophyta* (plantes a graines).

Sous Embranchement : *Magnoliophyta* (Angiospermes, phanérogames ou plantes à fleurs).

Classe : *Magnoliopsida* (ou Dicotyledones).

Sous classe : *Rosidae*.

Ordre : *Fabales*.

Famille : *Legumineuses*.

Genre : *Cicer*.

Espèce : *Cicer arietinum L.*

Nom commun : *Pois chiche*. USDA, (2008).

2.4 Morphologie de la plante

Le pois chiche, est une plante diploïde à $2n = 16$ chromosomes. A l'intérieur de l'espèce, la variabilité génétique est extrêmement importante et se trouve révélée par l'autogamie (Gridley, 1985).

La tige, est anguleuse d'une hauteur de 20 cm à 1 m (Allali *et al.*, 2007). Selon les conditions de l'agriculture (date de Semis- classe ; altitude - pluies) (ITGC, 2001).

La tige principale portent généralement deux branches primaires ainsi que sur les deux ramifications primaires apparaissent des ramifications secondaires (Allali *et al.*, 2007).

Les Feuilles du pois chiche est composé de deux paires de petites feuilles dentées dans son extrémité supérieure. Et la face inférieure d'une couleur foncée (ITGC, 2001).

La fleur du pois chiche est caractérisée par leur aspect de papillon, unique et autofécondation (ITGC, 2001). Leur couleur varie les blanches, verdâtres, rose ou violacées, disposées en grappe caractérisées par leur aspect de papillons (Bejiga et Van Der Maese, 2007).

Le fruit, est une gousse velue, globuleuses contenant une ou deux graine (Bejiga et Van Der Maes, 2007).

Les graines ont généralement une forme plus au moins arrondies, de couleur crème pâle et présentant une saillie en forme de bec (Elbakkay, 1984).

Les racines sont pivotantes, forte (ITGC, 2001). Bien développé peuvent atteindre jusqu'à plus d'un mètre de profondeur (Allali *et al.*, 2007).

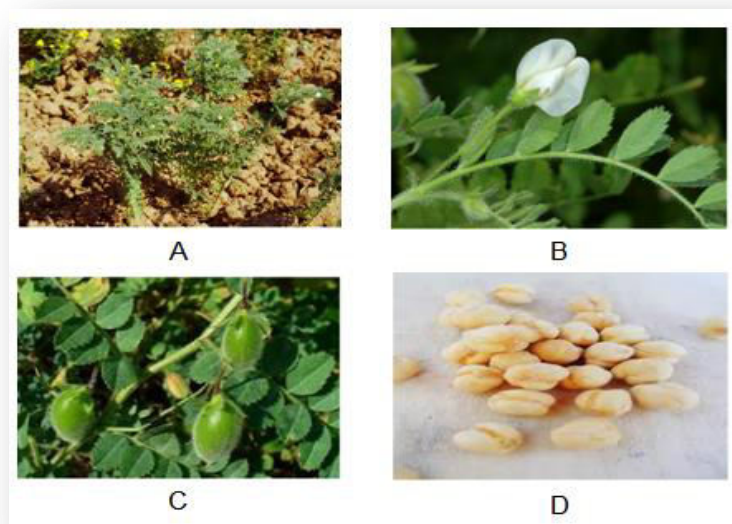


Figure 02: Le pois chiche (*Cicer aietinum L.*) (Maheri *et al.*, 2008).

A : Tige feuille et ramifiée

C : Gousse

B : Fleur blanche

D : Grain

2.5 La Composition moyenne du pois chiche

La graine de pois chiche renferme 38 à 59 % d'hydrate de carbone, 3% de fibre, 4.8 à 5.5 % de pétrole, 3% de cendre, 0.2% de calcium, 0.3 % de phosphore. La digestibilité de la protéine change de 76 à 78 % et de son hydrate de carbone de 57 à 60 % (Hulse, 1991).

2.6 Les type cultivars

Deux types de pois chiche sont cultivés et donnent lieu à des échanges commerciaux dans le monde :

2.6.1 Le type Kabuli

Essentiellement cultivé et consommé dans le bassin méditerranéen. La plante donne des graines lisses à légèrement ridés, clairs (blanc à jaune pâle) moyen à assez gros (PMG > 300g) recouvert d'un tégument mince (ITGC, 2013).

2.6.2 Le type Desi

C'est une plante qui donne des petits grains ridés, angulaires et noirs (ITGC, 2013).

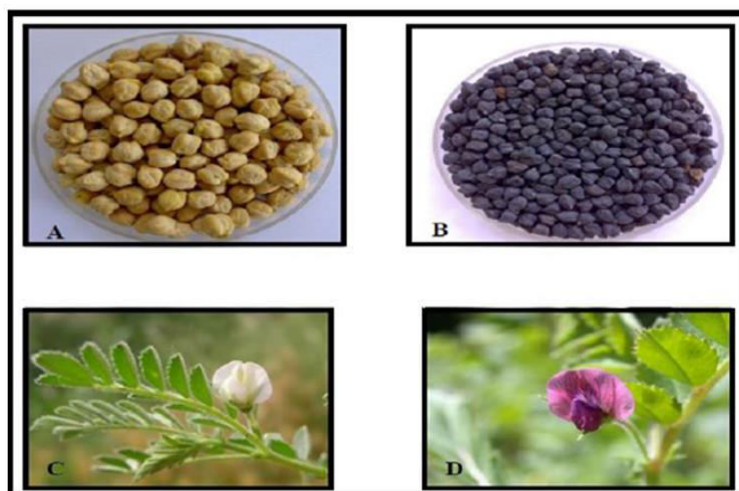


Figure 03: Les types de cultivars de pois chiche (Maheri *et al.*, 2008).

A : Pois chiche de type Kabuli.

B : Pois chiche de type Desi.

C: Pois chiche de type Kabuli.

D : Pois chiche de type Desi.

2.6.3 Le type gulabi

Ce style présent des caractères intermédiaires entre les deux types précédents. Ils présentent un grain lisse et clair, d'une taille moyenne (ITGC, 2013).

2.7 Type de culture

Dans nos conditions, deux types de culture de pois chiche sont pratiquées, notamment le pois chiche d'hiver et le pois chiche de printemps. Ils diffèrent entre eux par les dates de semis en novembre-décembre pour le pois chiche d'hiver et en fin février-début mars pour le pois chiche de printemps (Saccardo *et al.*, 1990).

Les semis pour le pois-chiche d'Hiver sont effectués entre le 10 et 30 novembre. Cependant, ce déplacement du cycle de culture impose à la plante de nouvelles conditions écologiques différentes de celles du printemps (Jana et schluter, 1977).

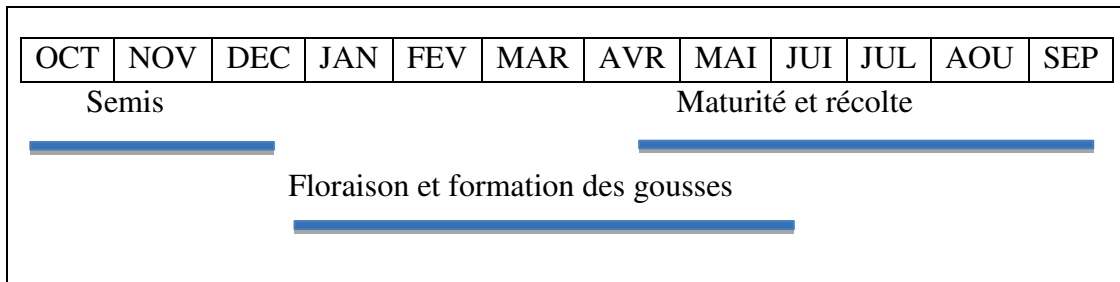


Figure 04: Cycle phénologique du pois chiche (Saxena, 1987).

2.8 Les différentes étapes de développement du pois chiche

Le développement du pois chiche se divise en deux étapes essentielles (ITGC, 2001), qui sont :

2.8.1 Phase végétative

Elle commence par la levée et se termine par la floraison, la vitesse de la levée est liée à l'humidité du sol, et à la température, le nombre de graines germées est lié à sa faculté germinative et la technique d'ensemencement, le taux de salinité du sol diminue la faculté germinative du pois chiche (ITGC, 2001).

Le développement de l'ensemble des organes végétatifs (feuilles et tiges) se fait doucement durant les jours qui suivent la germination, le nombre des tiges principaux varie entre 1 et 8, par contre le nombre de tiges secondaires varie entre 2 et 12 celles qui portent le plus grand nombre de feuilles. Cette phase se caractérise par sa sensibilité en vers les maladies et les mauvaises herbes (ITGC, 2001).

2.8.2 Phase reproductrice

Elle commence par la floraison et se termine par la maturation physiologique ce qui représente les graines de pois chiche récoltées, cette phase dure tout l'hiver. Cette phase se caractérise par sa sensibilité en vers la sécheresse, les graines mûrissent lorsque la tige devienne jaune claire et les graines durcissent (ITGC, 2001).

2.9 L'exigence de pois chiche

2.9.1 La température

Le pois chiche est une plante rustique qui tolère les fortes températures avec un optimum situé entre 21 et 29°C pendant le jour et entre 15 et 21°C pendant la nuit. Les basses températures, inférieures à 5°C, inhibent la formation des gousses. Le pois chiche ne tolère pas le froid, excepté quelques variétés qui peuvent supporter des températures allant jusqu'à -8°C. Les chaleurs excessives, en période de floraison, provoquent la coulure des fleurs et l'échaudage du grain (ITGC, 2013).

2.9.2 L'eau

Le pois chiche est une légumineuse qui présente une meilleure résistance à la sécheresse. Grâce à son enracinement profond, il peut extraire l'eau à partir des couches profondes allant jusqu'à 1.50 m. Ses besoins physiologiques se situent entre 300 et 400 mm (ITGC, 2013).

Les stress hydriques sont défavorables pendant la période de floraison. Le pois chiche est sensible à l'excès d'eau, car il provoque le prolongement du cycle de la culture et la rend plus sensible aux maladies (ITGC, 2013).

2.9.3 Le sol

Le pois chiche peut être cultivé sur différents types de sol, mais il préfère les sols lourds, profonds, bien drainés, de texture limoneuse et argilo-siliceuse. Il redoute les sols calcaires, qui prédisposent la plante à donner des graines à mauvaise cuisson. Il se comporte bien à un pH du sol allant de 6 à 9. Il est sensible à une mauvaise aération du sol et tolère la salinité (ITGC, 2013).

2.10 Situation de la culture du pois chiche

2.10.1 Dans le monde

La production mondiale du pois chiche a connu, durant la dernière décennie, une tendance à l'augmentation relativement marquée avec un taux d'accroissement (FAO, 2010).

L'Inde est le premier producteur mondial avec près de 70%, tandis que la production totale de l'Australie, le Pakistan, la Turquie, l'Iran, le Mexique et le Canada, représentent environ 27% de la production mondiale.

Au niveau Maghrébin, le Maroc est le pays qui consacre le plus de surface au niveau régional (FAO, 2010).

À l'échelle mondiale, l'Algérie se classe en 15^{ème} position par rapport aux superficies consacrées (22 600 ha), et en 16^{ème} position au regard de sa production (21 200 tonnes) (FAO, 2010).

2.10.2 En Algérie

Le pois chiche est la légumineuse la plus cultivée en Algérie dans les différentes zones agro-écologiques culture (ITGC, 2003).

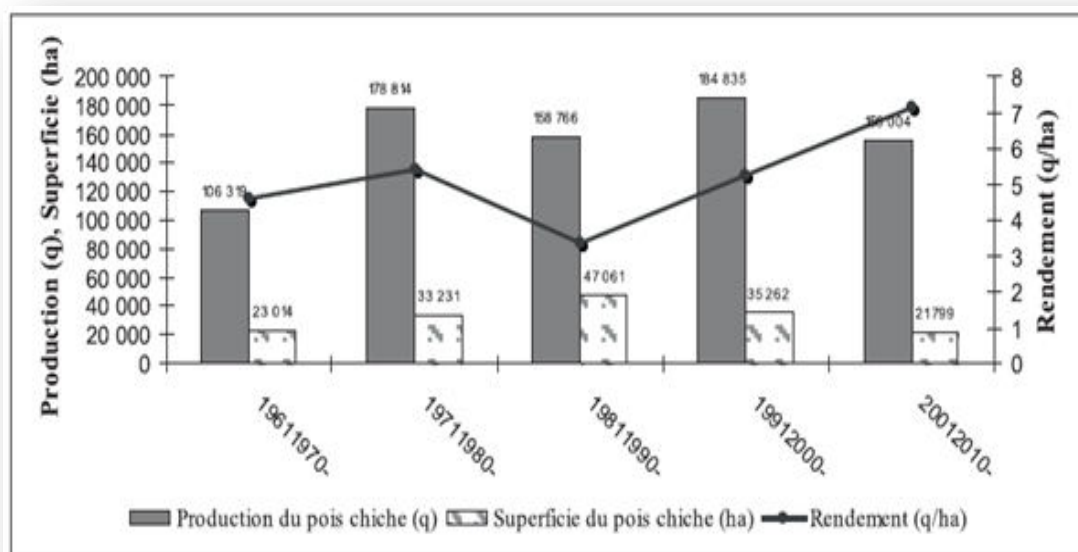


Figure 05: Evolution des superficies, des productions et des rendements du pois chiche durant la période 1961 -2010 en Algérie (Labdi, 1990).

2.11 Variétés cultivées en Algérie

Tableau 01: Les principales variétés cultivées en Algérie (ITGC, 2011).

Variétés locales	En multiplication	Nouvelles variétés introduites
Ain-Temouchent	Chetoui 1 (ILC 32 79)	Gab 4 (Flip 93 93 C)
Sabdou	Chetoui 2 (ILC 482)	Gab 5 (Flip 88 85 C)
Rabat 9	Flip 84 92 C	Flip 97 706 C
	Flip 90 13 C	

2.12 Les maladies affectant le pois chiche

Les maladies les plus observées sur la culture du pois chiche sont :

2.12.1 Anthracnose (*Ascochylarabiel*)

C'est une maladie fongique, transmise par les semences et par les résidus de récolte qui peuvent conserver le parasite pendant une durée de deux ans. La maladie se manifeste par des taches brunes, circulaires sur les feuilles et les gousses et allongées sur les tiges (ITGC, 2013).

2.12.2 Flétrissement ou wilt

C'est une maladie causée par un groupe de champignons pathogènes dont le plus fréquent est *Fusarium oxysporum cicer*. Les symptômes se manifestent par un flétrissement, avec une coloration vasculaire brune, plus ou moins claire. Une défoliation totale de la plante peut survenir (ITGC, 2013).

2.12.3 Le Stunt : Rabogrissement

La cause de cette maladie est le virus. Ce virus est transmis par deux types d'insectes :

Acyrtosiphon et *Aphis craccivora*. Et les symptômes de la maladie sont les feuilles changent de couleur du vert au jaune à l'orange puis au noir. En outre, la plante devient un nain et ses feuilles deviennent plus petit épaississement et la rigidité avant la maturité des plantes (ITGC, 2001).

Il est a noté que l'apparition précoce de ce virus est plus dangereux que la blessure retardé (ITGC, 2001).

2.12.4 La noctuelle

L'un des Lépidoptère. L'insecte adulte Il se nourrisse à partir de la sève du fleures des pois chiche. Habituellement, la femelle pond des œufs sur les fleurs, les larves se nourrissent des gousses et les fleurs, une petite pilule et est dans le processus de croissance. Et il peut résister aux pesticides chimiques ou l'utilisation des bactéries. Il est a noté que les variétés qui produisent de plus grandes quantités d'acide malique sont plus résistantes à cet insecte (ITGC, 2001).

2.12.5 Diptère

Charançons : appartenant à la famille des *Diptère*, c'est une mouche de petite taille, elle est considéré parmi les insectes les plus dangereux qui attaque le pois chiche en Algérie, elle détruit les feuilles de la plante donc diminue la faculté de la plante à réaliser la photosynthèse ainsi que la diminution du rendement (ITGC, 2001).

Le pois chiche est une espèce sensible aussi à la présence des plantes parasites telles que l'orobanche et la cuscute (ITGC, 2013).

2.13 Lutte contre les maladies

La lutte efficace contre les maladies réside dans l'utilisation de variétés résistantes et le traitement des semences et aussi par des rotations de longue durée 4 a 5 ans.

La lutte contre les ravageurs consiste en un traitement chimique (ITGC, 2013).

2.14 Utilisation du pois chiche

Le pois chiche est utilisé pour l'alimentation humaine et animale. Il constitue une importante source de protéines (20 à 25%), de minéraux et de lysine (acide amine indispensable et rare chez les céréales) (ITGC, 2013).

Sur le plan de l'alimentation humaine, l'utilisation du pois chiche est très variée. Il est utilisé dans les soupes, les salades, dans divers plats, sous forme de grains et la farine du pois chiche (ITGC, 2013).

Sur le plan de l'alimentation animale, la paille de pois chiche a la même valeur nutritive que la paille de blé. La valeur nutritive de matière sèche digestible est estimée à 50% (ITGC, 2013).

2.15 Utilisation médicinales traditionnelles

Parmi les légumineuses de nourriture, le pois chiche est l'agent *Hypocholestérolémiant*, on a rapporté que le pois chiche germé est efficace dans le contrôle de la cholestérolémie chez les rats (Geervani, 1991).

La sécrétion glandulaire des feuilles, des tiges et des gousses se compose d'Acides maliques et oxaliques, donnant un gout aigre (Geervani, 1991).

En Inde ces acides étaient moissonnés en répondant la mousseline mince au-dessus de la récolte pendant la nuit, le matin le tissu imbibé est extorqué dehors, et les acides sont rassemblés dans des bouteilles (Duc, 1981).

Les applications médicinales incluent l'utilisation pour l'aphrodisiaque, la bronchite, le catarrhe, le cutaménia, le choléra, la constipation, la diarrhée, la dyspepsie, la flatulence, l'insolation et les verrues, ces acides sont censés abaisser les niveaux de cholestérol dans le sang. Ces graines sont considérées anti bile (Duc, 1981).

Chapitre II

Notion de Rhizobium

1 Notion de *Rhizobium*

Les *Rhizobiums*, ou *Rhizobia* sont des bactéries aérobies du sol, Gram négatif, ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes, les légumineuses (**Moulin et al., 2001**). Cette symbiose confère aux légumineuses, l'aptitude unique parmi les plantes de grande culture de se nourrir à partir de l'azote de l'air (**Moulin et al., 2001**).

Possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 nm de largeur et de 1,2 à 3nm de longueur et non sporulant (**Jordan, 1984**).

Appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae*, ils sont généralement mobiles quand ils sont jeunes grâce à un seul flagelle polaire, ou deux à six flagelles péritriches. Quand ils sont âgés, ils possèdent un ou plusieurs granules réfringents de poly- B-hydroxyburate (PHB) (**Benson ; Clawson, 2000**).

Les *Rhizobium* forment des colonies incolores, blanche ou de couleur crème, sur le milieu de culture classique (mannitol et extrait de levure) (**Benson ; Clawson, 2000**).

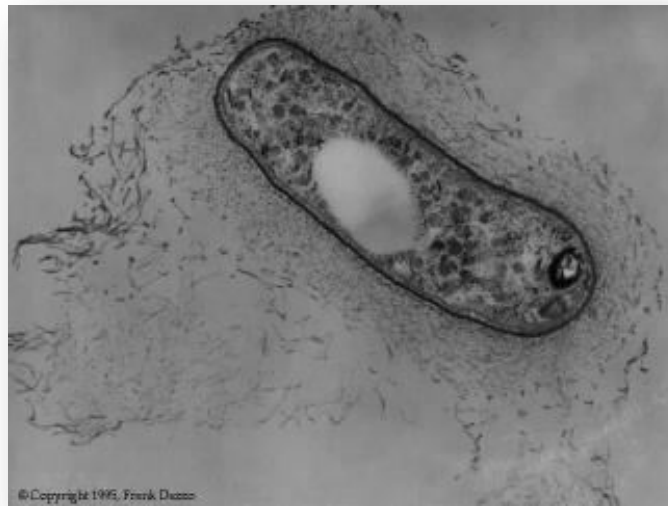


Figure 06: Morphologie de *Rhizobium trifolii* (**Dazzo, 1995**).

2 Taxonomie

La biodiversité microbienne forme une ressource naturelle énorme pour la vie sur terre. Les bactéries de racine (*Rhizobia*) sont en particulier utiles par leur capacités symbiotiques et à la fixation d'azote dans la symbiose avec leurs plantes hôtes (les légumineuses) (**Moulin et al., 2001**).

Les *Rhizobia* sont divisés en 40 espèces et 07 genres. Actuellement dans la relation symbiotique, des espèces fixatrices d'azote ont été également décrites parmi les genres

Burkholderia et *Cupriavidus* dans la sous classe des β - Protéobactéria (Moulin *et al.*, 2001).

Tableau 02: Classification des *Rhizobiacée* (d'après Munive, 2002).

Genres	Espèces	Principales plantes hôtes
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>Biovarviciae</i> <i>Biovartrifolii</i> <i>biovarphaseoli</i> <i>R.lupini</i>	Tréfle, Vesce, Pois, Lentille, ect Haricot Lupin
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	Lotier, Anthyllis, Lupin
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i> <i>S. fredii</i> <i>S. Saheli</i> <i>S. teranga</i>	Luerne, Melilot, Trigonelle Soja, Vigna Acacia, Sesbania
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	Tigeaérienne de <i>Sesbania</i> <i>rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i>	<i>Macroptilium</i> , Vigna, Soja
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunianatans</i>
<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>B. sp.</i>	<i>Aspalathus</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>

Cette classification est très loin de celle décrite dans le Bergey's Manual par **Jordan (1984)**, basé sur un ensemble de caractères phénotypiques, notamment la vitesse de croissance, où le genre *Rhizobium* regroupe les souches à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium*, les souches à croissance lente (**Jordan, 1984**).

Actuellement la taxonomie bactérienne moderne se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (surtout ADN, 16S comme marqueur taxonomique, les protéines totales, les acides gras,...), et de ce fait prend une nouvelle approche, la taxonomie polyphasique (**Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia *et al.*, 2004**).

A partir de là, la classification des *Rhizobia* évolue chaque année, regroupant les B.N.L. (ou Bactéries Nodulantes des Légumineuses) préférant au terme de *Rhizobia* (**Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia *et al.*, 2004**).

3 Génétique de la fixation

L'établissement de l'association implique des mécanismes de reconnaissance spécifique, qui sont orchestrés dans un véritable dialogue en plusieurs étapes entre la bactérie et la plante hôte (Munier et Salon, 2005 ; Andrews *et al.*, 2009).

Des signaux moléculaires associés à une synchronisation de l'expression de nombreux gènes sont ainsi mis en jeu chez les deux partenaires (Munier et Salon, 2005 ; Andrews *et al.*, 2009).

Les premiers signaux émis par la plante hôte sont des flavonoïdes. Ces molécules agissent sur la transcription des gènes Nod chez la bactérie. Les facteurs Nod produits sont impliqués dans la reconnaissance de la plante hôte ; ils se lient à des récepteurs spécifiques, situés sur l'épiderme de la racine, puis déclenchent ensuite les réactions qui vont conduire à l'infection des racines par les bactéries fixatrices symbiotiques (Munier et Salon, 2005 ; Andrews *et al.*, 2009).

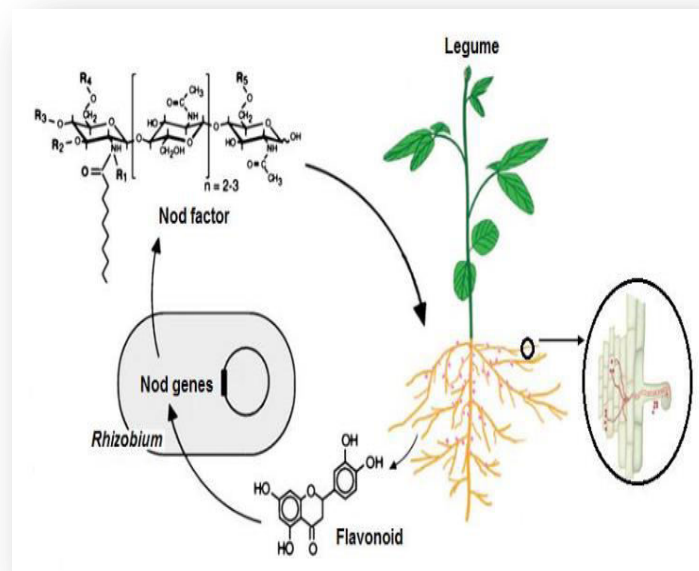


Figure 07: Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose *Rhizobium*/Légumineuse Nod- dépendant d'après (Lindstrom *et al.*, 2010).

4 Phénomène de la Nodulation

4.1 Formation des bactéroïdes

L'envahissement des bactéries dans des cellules de la plante hôte est débuté par la formation d'une gouttelette d'infection. Les gouttelettes d'infection peuvent former au bout des fils intracellulaires courts d'infection. Les bactéroïdes mûr de membrane de cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de PHB ou polyhydroxybutyrate (Juergen *et al.*, 2006).

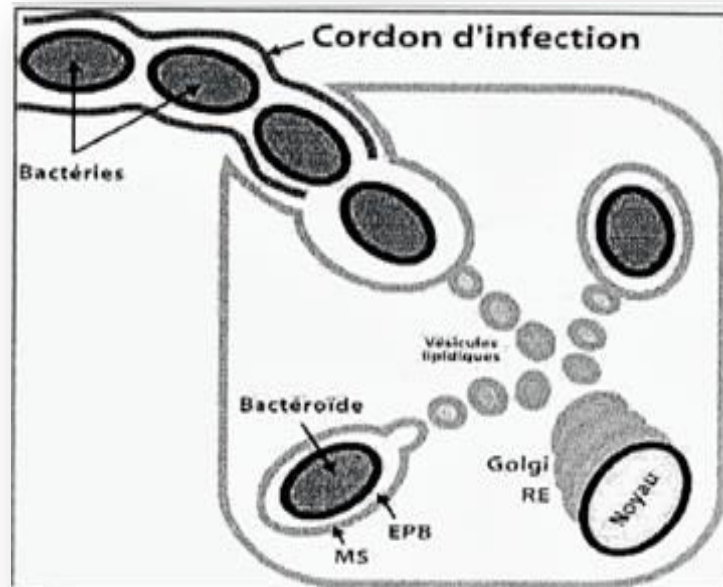


Figure 08: Infection intracellulaire et différenciation du Symbiosome chez les légumineuses (**Patricaria et al., 2004**).

Les bactéries sont déversées dans la cellule végétale par fusion des vésicules lipidiques avec l'extrémité du cordon d'infection. La différenciation en bactéroïdes commence alors **EPB**, espace pér bactéroidien ; **MS**, membrane du symbiosome ; **RE**, réticulum endoplasmique (**Patricaria et al., 2004**).

5 Mécanisme de la nodulation

L'association entre les *Rhizobium* et les légumineuses conduit à la formation d'un véritable organe, le nodule (Nodosité), dans lequel les bactéries fixent l'azote atmosphérique (**Benson ; Clawson, 2000**).

5.1 Définition de nodule

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactive par l'oxygène (**Ott et al., 2005**).

5.2 Structure et morphologie des nodules

Chez les légumineuses, la structure anatomique des nodules rappelle celle d'une tige, alors que chez les plantes *Actinorhiziennes* et (*Parasponia*) le système vasculaire et central

et la structure du nodule rappelle celle d'une racine (Munier et Salon, 2005 ; Andrews *et al.*, 2009).

Dans tous les cas, le nodule comporte, en allant de l'extérieur vers l'intérieure, l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siège de la fixation de N₂ (Munier et Salon, 2005 ; Andrews *et al.*, 2009).

5.3 Formation des nodosités

Une caractéristique remarquable de la symbiose *Rhizobia*- légumineuse est son degré élevé de spécificité, de nombreux signaux moléculaires spécifiques sont échangés entre les deux partenaires tout au long de la formation de la nodosité (Djordjevic, 2004).

Les flavonoïdes libérés par la plante constituent le premier signal moléculaire et permettent l'activation chez la bactérie des gènes de nodulation responsables de la production des facteurs Nod. Ces facteurs Nod sont capables d'induire les étapes clés intervenant lors de la formation de la nodosité (Djordjevic, 2004):

1) la fixation du *Rhizobia* sur le poil absorbant ainsi que la courbure du poil.

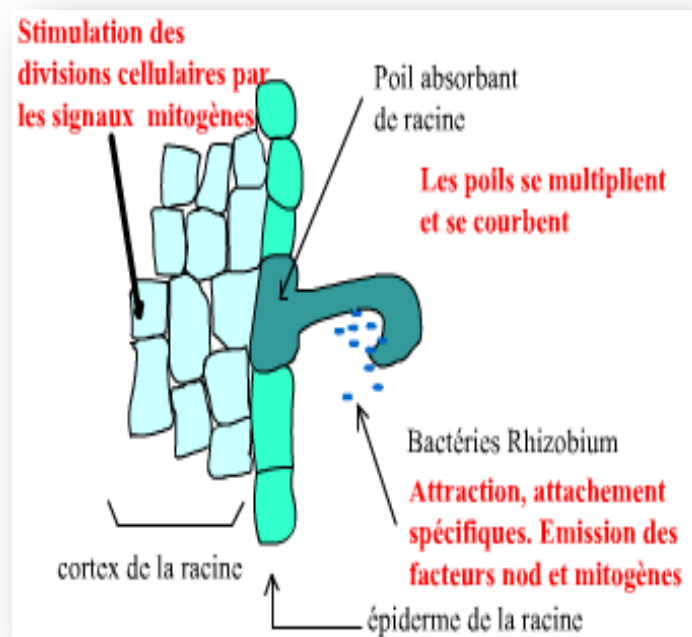


Figure 09: Schéma de la nodulation Etape 1 (William et Hopkins, 2003).

2) les étapes du processus d'infection via un cordon d'infection,

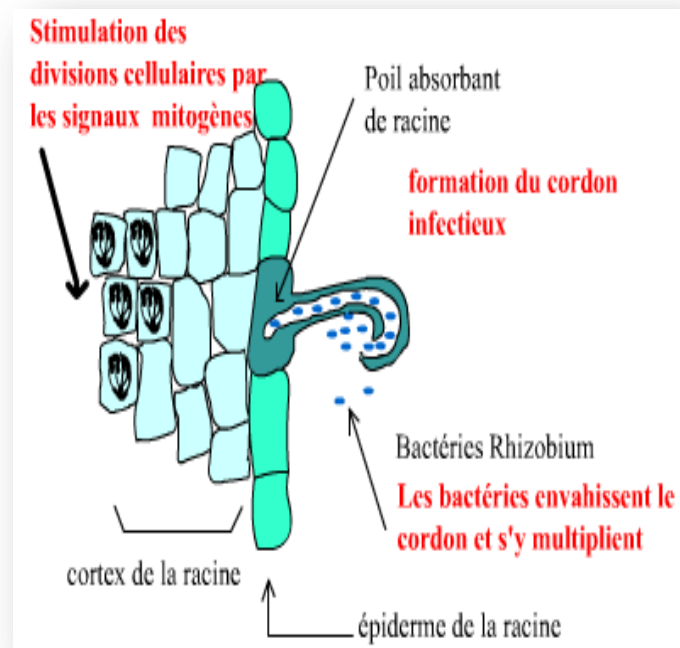


Figure 10: Schéma de la nodulation Etape 2 (William et Hopkins, 2003).

3) la division cellulaire corticale.

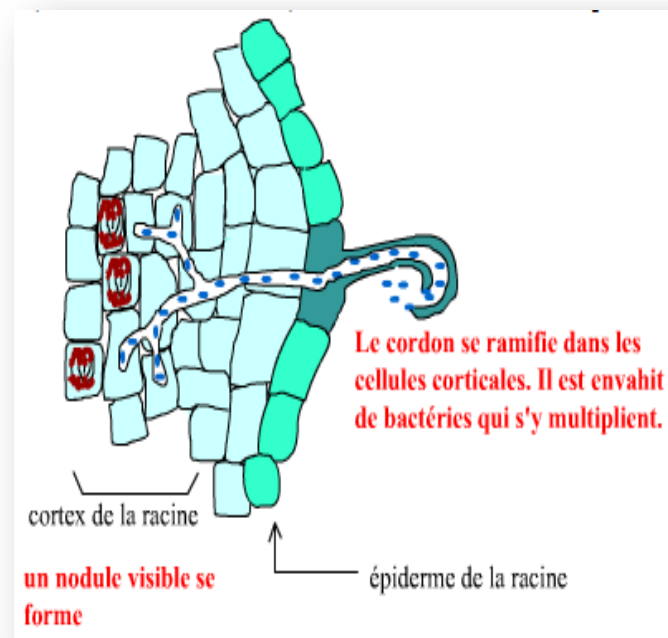


Figure 11: Schéma de la nodulation Etape 3 (William et Hopkins, 2003).

4) le primordium nodulaire se développe alors en nodosité pendant que les bactéries pénètrent dans les cellules végétales et se différencient en bactéroïdes formant ainsi le symbiosome dans lequel la fixation de N_2 va se réaliser.

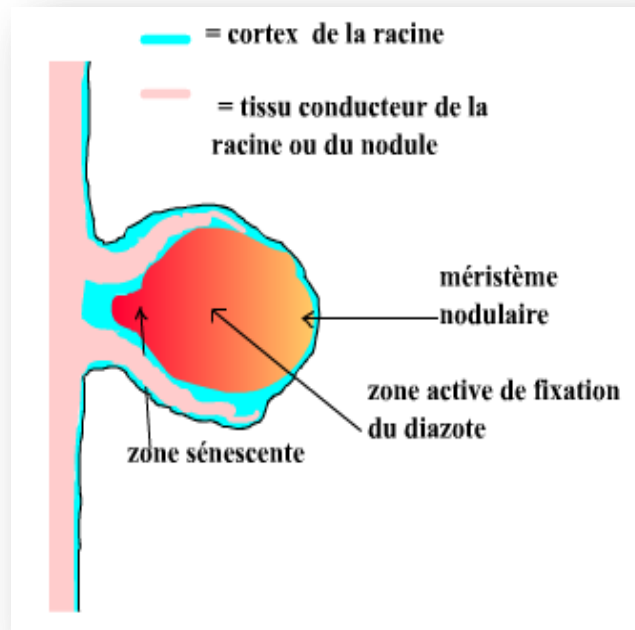


Figure 12: Coupe longitudinale de racine montrant un nodule fonctionnel (William et Hopkins, 2003).

6 Inoculation et compétition entre souches

La rhizosphère, zone du sol très riche en nutriments entourant la racine, est colonisée naturellement par plusieurs bactéries et champignons bénéfiques ou pathogènes qui peuvent avoir un impact considérable sur la croissance et le rendement des plantes (Kloepper et Schroth, 1978).

Les bactéries colonisatrices de la rhizosphère (*Rhizobactéries*) ayant un effet bénéfique sur la plante sont appelées *Rhizobactéries* favorisant la croissance des plantes (Kloepper et Schroth, 1978).

Le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium* sont des *Rhizobactéries* bien connues pour leurs effets bénéfiques chez les légumineuses, qui résultent de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Kloepper et Schroth, 1978).

L'inoculation des légumineuses avec des *Rhizobia* constitue une pratique permettant de réduire l'utilisation des fertilisants azotés de synthèse et d'améliorer le recyclage de l'azote dans les sols agricoles, ce qui se répercute sur la qualité de l'environnement (Stevenson, 1986).

Lorsque les *Rhizobia* spécifiques d'une légumineuse sont absents d'un sol ou en faible nombre, pour qu'il y ait nodulation et fixation symbiotique, les *Rhizobia* peuvent être apportés par inoculation (**Amarger, 1980**).

L'inoculation est réalisée au semis à partir d'un inoculant constitué le plus souvent d'une culture de *Rhizobia* sur un support tourbe. Cet inoculant doit apporter un nombre suffisant de bactéries par graine pour assurer une bonne nodulation de la plante (**Catroux et al., 2001**).

Lorsque les *Rhizobia* d'un groupe d'inoculation donné sont présents dans un sol, leur efficacité à fixer l'azote avec certaines espèces de ce groupe peut être faible ou nulle. Dans ce cas, il peut être difficile d'imposer une souche plus fixatrice, car elle va entrer en compétition pour la formation des nodosités avec les souches indigènes (**Amarger, 1980 ; Lindström et al., 2010**).

Le succès de l'intervention dépendra alors essentiellement des rapports de compétitivité et de nombre entre *Rhizobia* du sol et de l'inoculant, d'où la nécessité de chercher à caractériser les populations naturelles pour pouvoir maîtriser le phénomène (**Amarger, 1980 ; Lindström et al., 2010**).

Chapitre III
Relation symbiotique
Rhizobium-légumineuses

1. La symbiose

Du grec (sym ; avec) et (bios ; vie), illustre l'interaction permanente (obligatoire), de deux ou plusieurs organismes, l'absence d'autonomie. La symbiose, c'est à-dire une association à bénéfice réciproque. Cependant, la réduction de l'azote atmosphérique est un processus très coûteux en énergie (**Smil, 2002**).

Il existe des plantes (notamment légumineuses) capables de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire de partenaires symbiotiques : les *Rhizobium*, et cela dans un contexte de micro aérobie (**Gage, 2004**).

Par cette symbiose, les plantes sont capables d'utiliser l'azote atmosphérique et de l'intégrer dans le squelette des protéines (**Gage, 2004**).

2 La fixation d'azote

Les légumineuses ont une relation symbiotique avec les *Rhizobium* afin de convertir l'azote atmosphérique (N_2) en une forme adaptée aux plantes. Ce processus est appelé la fixation azotée (**Adjei et al., 2002**).

C'est une réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammonium (NH_3) ; cette forme de N combiné, appelé intermédiaire clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (**Gillet, 2001**).

2.1 L'azote

Les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées grâce au réservoir atmosphérique (N_2) (**Smil, 2002**).

Pourtant l'azote est, après l'eau, le principal facteur limitant la croissance des végétaux. En effet, pour être utilisable par les végétaux, l'azote doit être sous forme minérale (NH_4^+ et NO_3^-). L'azote est aussi un élément majeur des enjeux environnementaux (**Smil, 2002**).

Trois sources sont à l'origine des composés azotés actifs sur la planète : la fixation symbiotique, la production industrielle d'engrais et les processus de combustion (**Sutton et al., 2013**).

2-2 Le cycle de l'Azote

Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (**Drevon et al., 2004**).

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée et le cycle commence (**Drevon et al., 2004**).

✓ Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions NO_3^- puisés dans le sol (**Drevon et al., 2004**).

✓ Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leurs propres matières organiques azotées. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal (**Drevon et al., 2004**).

✓ Les décomposeurs du sol (les bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+ (**Drevon et al., 2004**).

✓ D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes transforment le NH_4^+ en nitrates (NO_3^-) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH_4^+ qui se forme directement à partir d'ammoniac (**Drevon et al., 2004**).

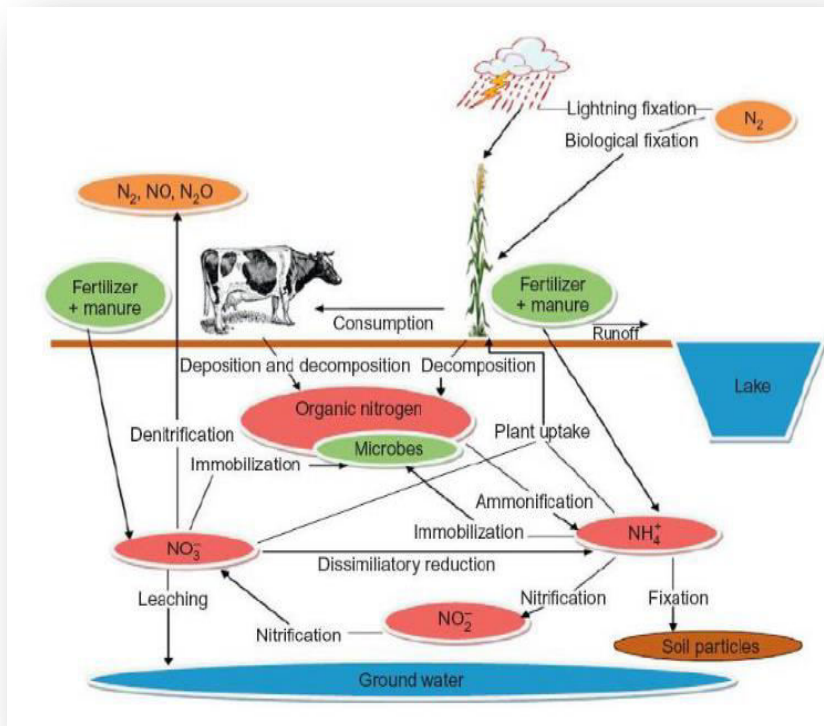


Figure 13: Le cycle de l'azote (**Luce et al., 2011**).

2.3 La fixation d'azote

Il existe deux processus naturels différents, permettent la transformation de l'azote gazeux en azote assimilable par les plantes (**Hopkins, 2003**)

2.3.1 La fixation physique

En temps d'orages, au voisinage des éclairs, les hautes températures et pressions engendrées permettent la formation d'oxydes d'azote qui retombent au sol avec la pluie (**Pelmont, 2005**).

2.3.2 La fixation biologique

La fixation biologique du diazote N_2 (diazotrophie), est le mécanisme principal permettant l'introduction d'azote dans la biosphère (**Peoples et al., 2009 ;Duc et al., 2010**).

La fixation biologique de l'azote est un processus métabolique exclusivement réalisé par les organismes procaryotes : certaines bactéries et cyanobactéries libres dans le sol ou l'eau, et les bactéries symbiotiques des légumineuses (**Peoples et al., 2009 ;Duc et al., 2010**).

Dans le monde végétal, les légumineuses ont la capacité de mettre en place une symbiose avec certaines bactéries naturellement existantes dans le sol et qui convertissent l'azote de l'air (N_2), présent dans leur environnement, en une forme intermédiaire (ammonium NH_4^+) qui est alors assimilable par la plante pour constituer les molécules organiques (notamment les protéines) (**Peoples et al., 2009 ;Duc et al., 2010**).

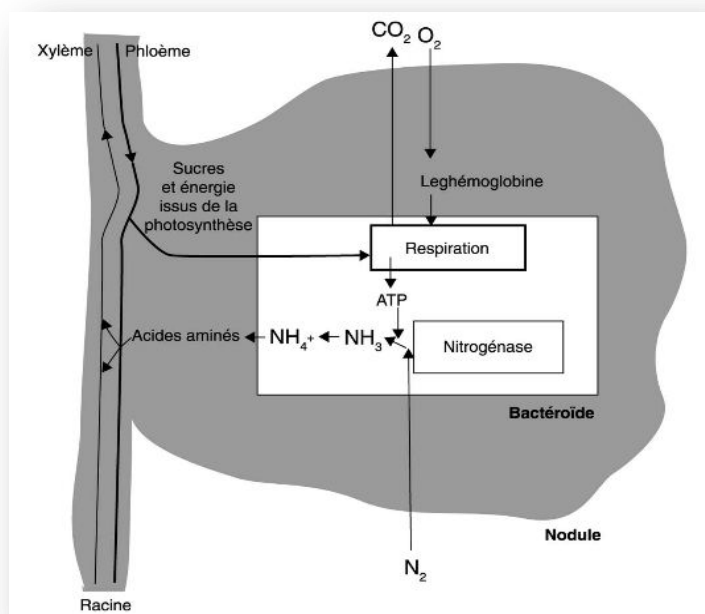


Figure 14: Les échanges réciproques de nutriments entre la plante et le *Rhizobium* hébergé et transformé en bactéroïde dans le nodule (**Peoples et al., 2009 ;Duc et al., 2010**).

Cette symbiose naturelle permet à la plante d'utiliser directement l'azote de l'air environnant pour sa croissance. On parle de plantes fixatrices d'azote et de fixation symbiotique (symbiotic nitrogen fixation, ou biological nitrogen fixation, BNF) (Peoples *et al.*, 2009 ;Duc *et al.*, 2010).

La forme la plus connue d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, des structures multicellulaires hypertrophiques nommées nodules (Hopkins, 2003).

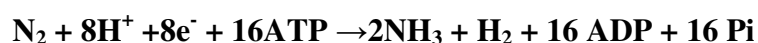
Tableau 03: Estimation des apports de produits azotés réactifs dans la biosphère (10⁶ T/an) ; d'après Schlessinger (2009).

	Flux du période préindustrielle	Flux supplémentaires dus aux activités humaines	Flux annuels totaux
Fixation biologique	1	20	140
Fixation atmosphérique (orages)	5	0	5
Fixation industrielle (fertilisants)	0	125	125
Combustion de carburants fossiles	0	25	25
Apports totaux	125	170	295

2.4 La nitrogénase et son fonctionnement dans la fixation d'azote

Les *Rhizobiums* peuvent fixer l'azote grâce à une enzyme, la Nitrogénase se dégradant très facilement au contact de l'oxygène, même en quantité réduite (Robson et Postgate, 1980).

Le processus de la fixation d'azote, apparus dans la réaction suivante (Dommergues *et al.*, 1999)



Cette réaction de fixation de N₂ est catalysée par un complexe enzymatique appelée nitrogénase (Dixon et Wheeler, 1986).

Présente chez certains micro-organismes (procaryotes) (Peoples *et al.*, 2009 ;Duc *et al.*, 2010).

2.5 La leghémoglobine

Une particularité métabolique des *Fabacées* est la présence d'une hémoprotéine fixatrice de dioxygène, la leghémoglobine (Leghb), très proche de l'hémoglobine. Cette protéine se trouve dans les nodules des racines et permet de fixer l'oxygène pour former un milieu anaérobie favorable à la fixation du N₂ par le *Rhizobium* (Peoples *et al.*, 2009 ;Duc *et al.*, 2010).

2.6 L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques et la chlorophylle (Epstein, 1972).

Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Layzell, 1990).

L'assimilation classique de l'azote s'opère au niveau des racines sous la forme de nitrates (Gage, 2004).

L'azote joue un rôle essentiel dans le développement de la plante et dans le rendement des récoltes en stimulant la croissance végétative par l'augmentation de la densité florale de la couverture végétale et les préservations des feuilles par le retardement de la vieillesse de la plante (Robert et Catesson, 1999 ; Ameziane, 1994).

D'après Hassan (1992) ; Richter (1993) et Sahaf (1989), la diminution de l'azote dans la plante provoque un jaunissement des feuilles en raison de la perte de la chlorophylle.

Brill (1977) et Clakson (1985) ont montré que l'étage supérieur des feuilles présente une couleur vert clair et une diminution du développement de la plante qui se traduit par de petites feuilles et une plante de petite taille, ces observations ont été confirmées par Ibrahim Khalil (1998), il a montré qu'une carence en azote donne la mort aux bourgeons apicaux ce qui provoque l'arrêt du développement de la plante ainsi que le système racinaire.

D'après Shanmugam *et al.* (1997), la carence en l'azote conduit à une diminution du nombre des fleurs des plantes fruitières, et même en cas de formation de cette dernière leur développement sera très lent avec une petite taille et une chute rapide.

(Shah *et al.*, 1984; Neupert et Schatz, 1981) ont montré que les protéines sont les premiers touchés par la carence en azote, en diminuant la synthèse de ces molécules, en causant une atrophie des cellules et ralentit la division cellulaire.

3 La spécificité symbiotique

Les bactéries fixatrices d'azote vivent soit de façon libre, soit en association avec des organismes plus complexes (végétaux ou animaux). Le cas de l'association des légumineuses avec les bactéries du genre *Rhizobium* (ou parfois *Bradyrhizobium*) est le cas le plus important pour l'agriculture (**Rosenberg, 1997**).

Les *Rhizobia* vivant librement dans les sols où des légumineuses ont été cultivées, mais qui ne fixent l'azote qu'une fois associées à la légumineuse spécifique avec laquelle elles sont compatibles (**Rosenberg, 1997**).

La spécificité de la symbiose est plus ou moins large, une souche bactérienne donnée étant capable de s'associer avec seulement quelques espèces légumineuses (cas de *R. meliloti*), ou quelques dizaines de genres (cas des *Vicia*), voire plus de 70 genres dans le cas extrême de *Rhizobium sp.* (**Rosenberg, 1997**).

Chapitre IV

Métabolites secondaires

1 Généralités

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides) (**Ferrari, 2002**).

Les plantes produisent, en plus un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés : métabolites secondaires. Ils constituent un groupe de produit naturels qui sont exploré pour des propriétés diverses : antioxydants, antimicrobiennes, anti inflammatoires, anticancéreuses... etc (**Epifano et al., 2007**).

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grands nombre, plus de 200.000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité (**Hartmann, 2007**).

Ils sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes (**Cuend, 1999 ; Vermeris, 2006**).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentielle dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix et al., 2005**).

2 Les polyphénols

2.1 Définition

Les polyphénols sont des molécules organiques, synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementaux. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes (racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit) selon l'espèce végétale et le groupe poly phénolique considérés (**Dangles et al., 1992, Hagerman et al., 1998 ; Sarni et Cheynier 2006**).

2.2 Biosynthèse des composés phénoliques

2.2.1 La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Yao et al., 1995**).

2.2.2 La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Yao *et al.*, 1995).

1 Les flavonoïdes

3.1 Définition

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C6-C3-C6), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (Bouakaz, 2006).

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Ghestem *et al.*, 2001).

À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem *et al.*, 2001).

3.2 Structure chimique et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone (figure 15), fait de deux cycles benzéniques C6 reliés par une chaîne en C3. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale (Milane, 2004).

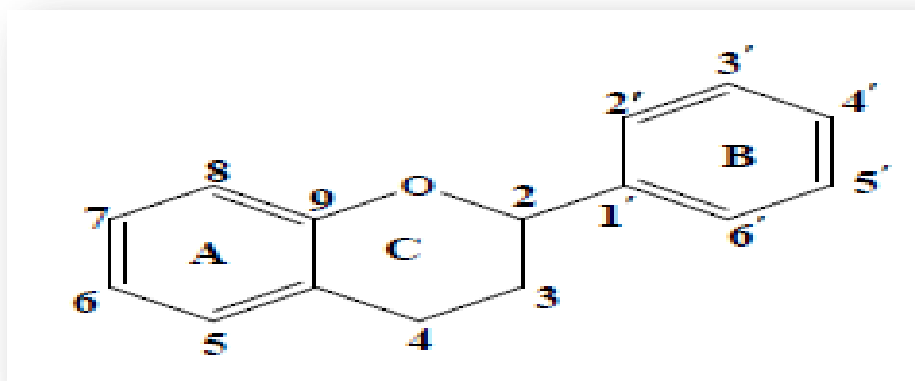


Figure 15: La structure de base d'un flavonoïde (Sarni et Cheynier, 2006).

3.3 Les principales classes et structures de flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiol, flavanols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Effendi et al., 2008**).

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances (**Heller et Forkmann, 1993**).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (**Afanas et al., 2001**).

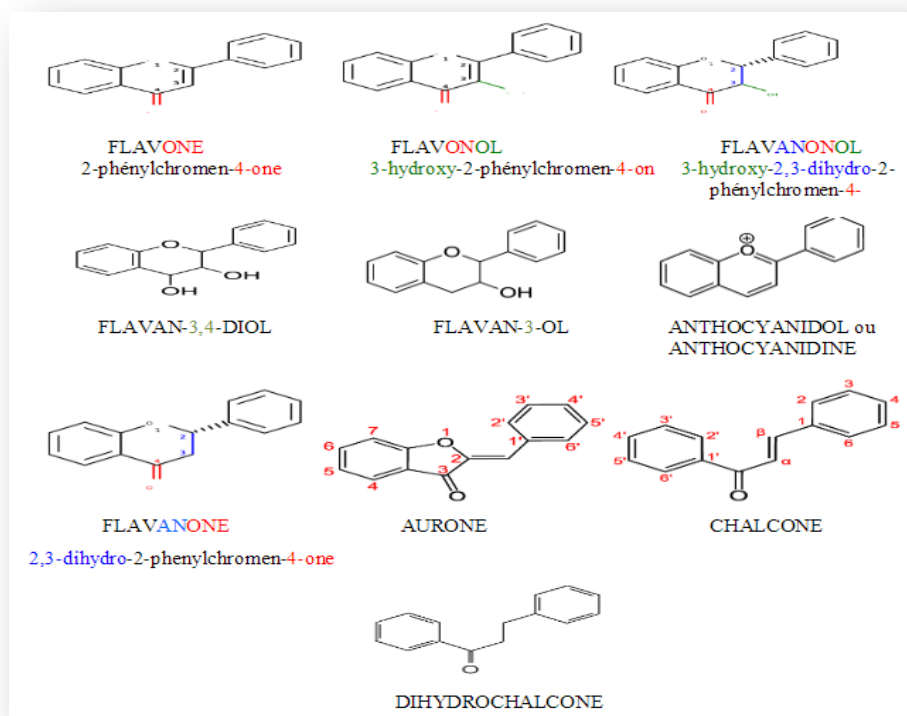


Figure 16: Les principales classes et structures de flavonoïdes (**Scalbert et Williamson, 2000**).

3.4 Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs et les racines (**Medic et al., 2003 ; Mohammadi, 2005**).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (Medic *et al.*, 2003 ; Mohammedi, 2005).

3.5 Biosynthèse des flavonoïdes

Toutes les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ne sont pas encore clairement élucidées, mais elles constituent l'une des plus élaborées en rapport avec les métabolites secondaires (Harbone et Williams 2001 ; Machiex, 2005). Grâce à des réactions enzymatiques, un grand nombre de sous-classes de flavonoïdes deviennent des intermédiaires.

Tableau 04: Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes (Harbone et Williams 2001 ; Machiex, 2005).

Enzymes	Intermédiaires synthétisés
Chalconesynthase (CHS)	Chalcone
Chalcone Isomérase (CHI)	Flavanone
Flavone Synthase (FS)	Flavone
Flavanone-3-Hydroxylase (F3H)	Dihydroflavonol
Flavonol Synthase (FLS)	Flavonol
Chaîne enzymatique (FNR, ANS, GT)	Dérivés anthocyaniques

3.6 Activité antimicrobienne des flavonoïdes

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études (Ulanowska *et al.*, 2006).

Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska *et al.*, 2006).

Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique, et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams., 2000).

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries:

Staphylococcus aureus (Babayiet al., 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska *et al.*, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* etc... (Modak, 2009 ; Okigbo *et al.*, 2008).

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllusa* à montrer l'efficacité des flavonoïdes glycoside, sur des souches fongiques (Galeotti *et al.*, 2008).

Récemment des études ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (**Mahmoud *et al.*, 1993**).

Certains chercheurs (**Spedding *et al.*, 1989**) ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase inverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte; bloquant ainsi tout le processus infectieux.

3.7 Autres activités des flavonoïdes

À côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités: Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Middleton et Elliott., 1996**), ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Mookerjee *et al.*, 1986 ; Namgoong *et al.*, 1994**).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (**Chaudhry, 1983**).

OngetKhoo n'ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (**Ong et Khoo., 2000**).

Deuxième partie
Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I Dispositif expérimental

1 Site

Le travail expérimental s'est déroulé dans la pépinière de Kais qui se situe à 20 Km de la Wilaya de Khenchla (culture en champs), compagne agricole 2016/2017.

2 Station pépinière de Kais

Il s'agit d'une opération de plantation des 04 variétés du pois chiche sur une parcelle de terrain d'une surface de 200 m² (21.5 m x 8.5 m) pendant le mois de janvier 2017, avant la mise en place des bassins de culture , la préparation du terrain de laboure s'effectue comme suit :

- ✓ Les travaux de laboure été effectués à 30 jusqu'à 45 cm de profondeur par un tracteur en mois d'Aout 2016.
- ✓ Le Hersage au moyen du Roto herse qui permet le traçage des sillons en mois de décembre 2016.
- ✓ Le traçage des bassins de semis.
- ✓ L'Ensemencement des grains de pois chiche selon le plan de semi le 10 janvier 2017.
- ✓ Un premier désherbage manuel en mois d'Avril 2017.
- ✓ La collecte des échantillons **phase 01 ramification** en mois de Mars 2017.
- ✓ La collecte des échantillons **phase 02 floraison** en mois d'Avril 2017.
- ✓ La collecte **des nodules** concernés en mois d'Avril 2017.
- ✓ La collecte des échantillons **phase 03 formation des gousses** en mois de Mai 2017.
- ✓ La collecte des échantillons **phase 04 remplissage des gousses** en mois de Juin 2017.
- ✓ Séchage des échantillons collectés de chaque phase à l'abri de la lumière, pour analyse (Voir annexe 03).

3 Caractéristiques des variétés de pois chiche étudiés

Il s'agit des variétés suivantes : **FLIP 85-55, FLIP 84-92, ILC 32-79, GAB 40.**



Photographie 01: Les 04 variétés du pois chiche étudiées.

Tableau 05 : Origines et caractéristiques des variétés du pois chiche étudiées (*Source I.T.G.C El Khroub*).

Variétés	FLIP 85-55	FLIP 84-92	ILC 32-79	GAB 40
Origine	Icarda-Syrie	Icarda-Syrie	Stepnoj Ex URSS	Stepnoj Ex URSS
Caractéristiques Culturelles				
Cycle végétatif	Tardif	Semi tardif	Non tardif	Semi tardif
Floraison		130 jours	150 jours	130 jours
Maturité		168 jours	210 jours	200 jours
Caractéristiques Morphologiques				
Ramification	Moyen à fort	Forte	Faible	Forte
Port de la plante		Semi érigé	Erigé	Semi érigé
Hauteur d'insertion de la 1 ^{ère} gousse		23 cm	30 cm	35 cm
Hauteur de la plante		52 cm	70 cm	52 cm
Couleur de la fleur	Blanche	Blanche	Blanche	violet
Nombre de gousse par plante		170	120	170
Taille de la gousse	Grande	Moyenne	Petite	Moyenne
Nombre de grains par gousse		1	1	1
Déhiscence des gousses		Sans	Néant	Sans
Couleur du grain	jaune	Beige	Beige	Beige
Forme du grain	Ronde	Angulaire	Ronde	Angulaire
Taille du grain	grande	Moyenne	Petite	Moyenne
Comportement à l'égard des aléas climatiques				
Gelée	Tolérante	Tolérante	Tolérante	Tolérante
Froid		Tolérante	/	Tolérante
sécheresse		Tolérante	/	Tolérante
Verse physiologique	Résistante	Résistante	/	Résistante
Productivité				
Rendement	élevé	33.06 Qtx/Ha	26.50 Qtx/Ha	40 Qtx/Ha
Poids de 100 graines		35 grammes	26 grammes	38 grammes

II Isolement et caractérisation du *Rhizobium*

1 Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1 Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines du pois chiche cultivé à La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par **Vincent, (1970)** et **Somasegaran, et Hoben (1994)**. Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet.



Photographie 02 : Nodules de la plante hôte (*Cicer arietinum L.*).

1.2 Conservation des nodules

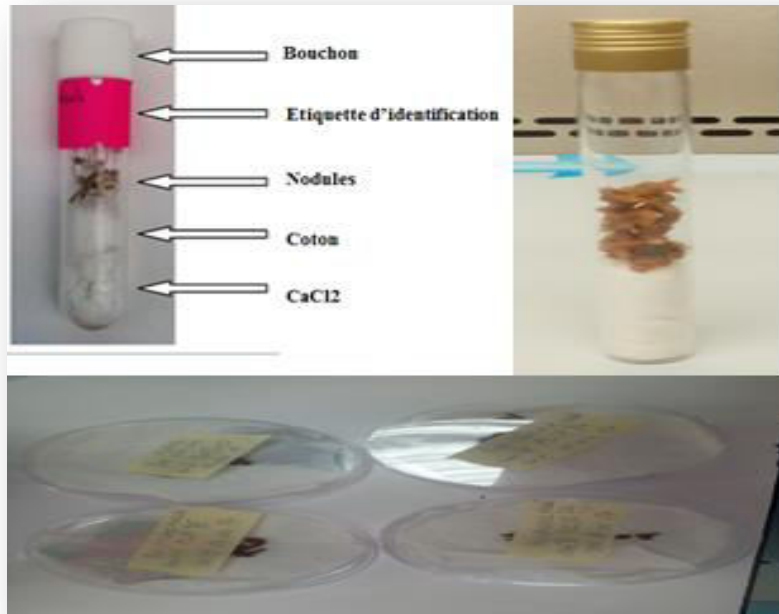
Les nodules séchées au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 04 C° jusqu'à 48 h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium (Ca Cl_2) (**Vincent, 1970**).



Photographie 03: Les nodules du *Cicer arietinum L.*

Sur chaque flacon sont mentionnées :

- ✓ Le nom de la plante : pois chiche (*Cicer arietinum L.*).
- ✓ Date et lieu de collecte : 11/04/2017 Pépinière-Kaïs.
- ✓ La date de conservation : 11/04/2017.



Photographie 04: Les nodules conservés sous CaCl₂.

1.3 Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés 05 à 10 secondes dans l'éthanol 95% puis transférés dans une solution de Chlorure de mercure (Hg Cl₂) acidifié à 0,1% pendant 02 à 03mn, ensuite sont rincés 05 à 07 fois à l'eau distillée stérile (**Vincent, 1970**).



Photographie 05: Les étapes de stérilisation des nodules.

1.4 L'écrasement des nodules

L'écrasement est réalisé selon la méthode de **Vincent, (1970)**. Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de pétri stérile.



Photographie 06: Les nodules stériles écrasés dans une goutte d'eau distillée.

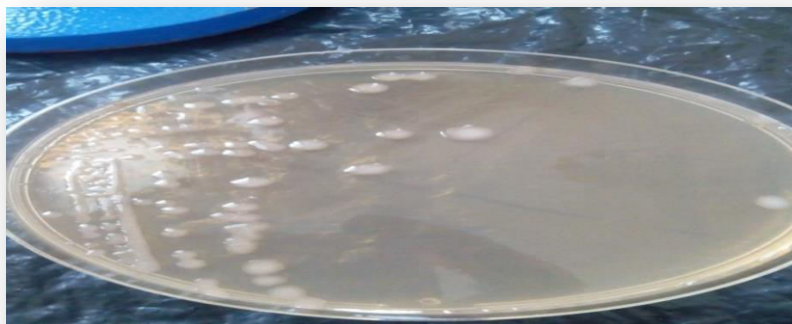
L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée,...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA). **Vincent, (1970)** à pH neutre (6,8) additionné de rouge Congo (**Voir annexe 02**). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les boîtes sont incubées deux à trois jours à 30°C.



Photographie 07: L'ensemencement selon la technique des quatre cadrans.

1.5 Observation des colonies :

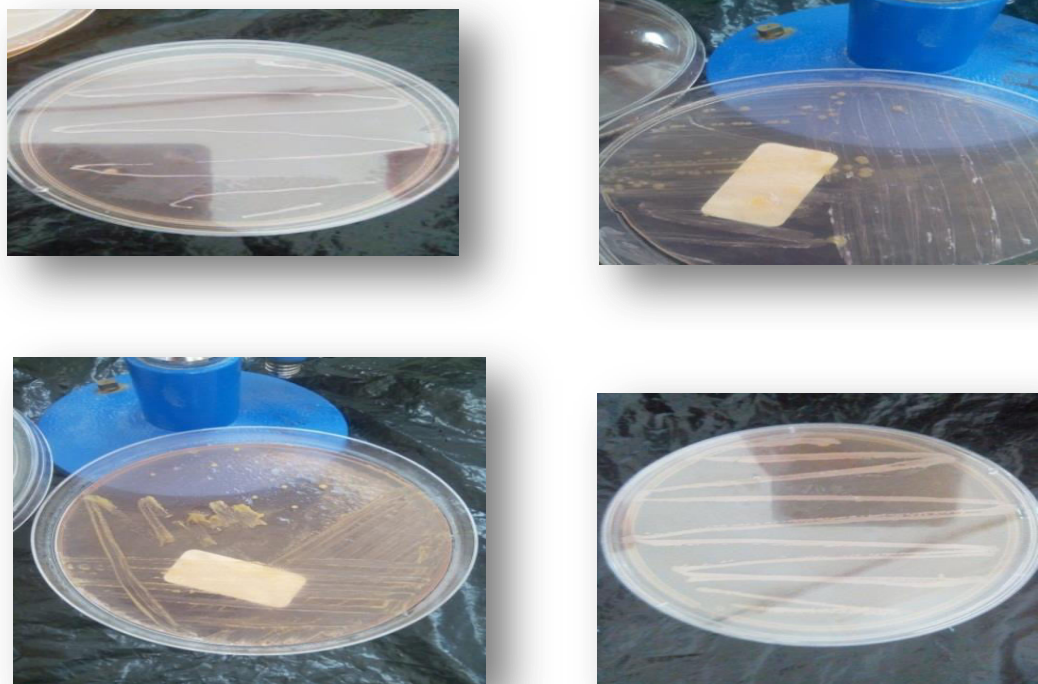
Après l'incubation un examen morphologique des colonies sur milieu YMA. Les espèces sont stockées au réfrigérateur en vue de leur dénombrement et leur caractérisation.



Photographie 08: L'observation des colonies après incubation à 30°C.

1.6 Repiquage des souches bactériennes

Après l'identification des isolats selon leurs caractères morphologiques, des repiquages réguliers ont été nécessaires pour leur purification. Dans des conditions d'asepsie, une colonie de chaque souche est ensemencée sur milieu YMA au rouge Congo. Cette méthode de repiquage peut être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.



Photographie 09: Repiquage des isolats.

2 Dilutions décimales

Les préparations des suspensions et les dilutions décimales consistent à disposer sur un portoir une série de **48 tubes** stérilisés contenant chacun **09ml** de l'eau physiologique.

Chacun des 03 tubes à essai contiennent un échantillon des nodules écrasés pour une seule variété de pois chiche dans une solution mère (SM), Exemple (SM1**GAB 40**, SM2 **GAB 40**, SM3 **GAB 40**).

Ensuite on prend 01 ml de la solution mère et on la met dans le tube 01, agiter par vortex, c'est la suspension de la dilution 10^{-1} , ensuite on la transféré dans le tube 02il s'agit de la suspension dilution 10^{-2} , agiter par vortex, et la transféré dans le tube 03 10^{-3} , la même opération est effectué pour les 04 variétés du pois chiche étudiés.

3 Dénombrement des souches bactériennes

La détermination du nombre des souches bactériennes est effectuée avec la dilution qui donne un nombre de bactérie compris entre **01** et **150**. Le nombre des souches bactériennes étant la moyenne des trois répétitions.

III Dosage et extraction des flavonoïdes

1 Matériel végétal

Notre travail a porté sur la plante *Cicer arietinum L.* (le nom commun est pois chiche), appartenant à la famille des *Fabacées*. Cette légumineuse est récoltée en mois d'avril 2017 au niveau de la pépinière de Kais- Khenchla. .

La partie aérienne (feuilles) et la partie souterraine (les racines) des quatre phases du développement du pois chiche (ramification, floraison, formation des gousses, et remplissage des gousses), des quatre variétés de la plante sont séchées, broyées et conservées dans des sachets en papier à l'abri de la lumière et de l'humidité broyées à l'aide d'un broyeur.

Les poudres végétaux récupérées sont conservés dans des petits sacs le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction et le dosage des flavonoïdes.

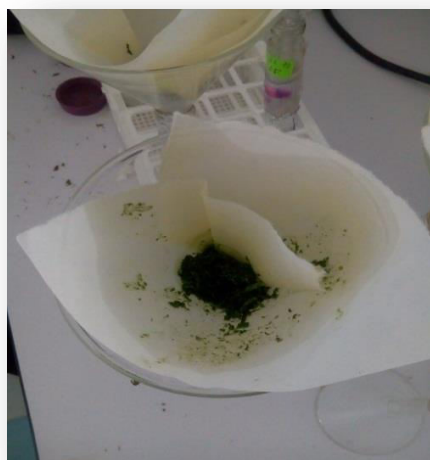
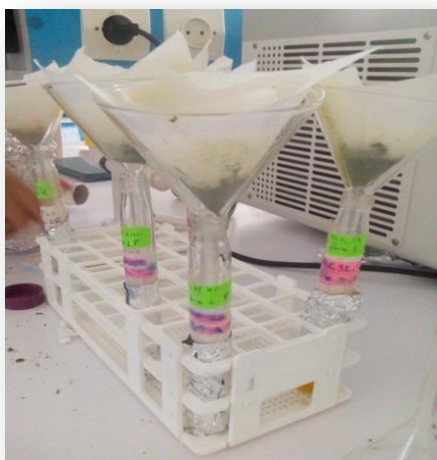


Photographie 10: Récolte, séchage des 04 variétés du pois chiche durant les 04 phases de développement.

2 Extraction des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont extraits par la méthode d'Upson *et al.*, 2000 (01gramme) de poudre végétale (feuille ou racines) des 04 variétés du pois chiche étudiés sont mis en contact avec **10 ml** de méthanol aqueux à **70%** (Voir annexe 04). Le tout est chauffé à **70°C** pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal, empêchant l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique).

Après macération pendant 48 heures, le mélange a été centrifugé par une centrifugeuse à une vitesse de **4000 tr/min** pendant une durée de **10 min**. En renouvelant le solvant et filtration sur papier filtre, le filtrat est évaporé sous vide à sec.



Photographie11: Extraction et filtration du solvant sur papier filtre.

3 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. **500 µl** d'extrait brut sont mélangés à **2**

ml d'eau distillée et **150 µl** d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à **15%**. Après 6 minutes, **150 µl** de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$) à **10%** sont additionnés. Après 6 minutes d'incubation, **2 ml** d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont incorporés et le volume final est complété à **5 ml** avec de l'eau distillée.

L'ensemble est agité au vortex puis laissé reposer pendant 15 minutes. La lecture se fait à **510 nm** contre un blanc.

Les résultats sont exprimés en **mg équivalent quercétine (mg EQ)** par **100 grammes** de matière végétale sèche (Kim, Chun, Kim, et al 2003).

4 Lecture par spectrophotométrie

Une lecture à l'aide de la spectrophotométrie à une longueur d'onde équivalent à **510 nm** des différents diluants des 04 phases de développement des 04 variétés de notre plante, ainsi que des deux parties (racines et feuilles) , afin de déterminer la densité optique (03 répétitions pour chaque lecture) , cette densité optique va nous permettre de déterminer la concentration en mg/g Equivalent Quercetine) des différents échantillons sur une courbe d'étalonnage de la quercetine un polyphénol identique au flavonoïdes va nous permettre de déterminer ces concentrations à l'aide de l'équation suivante : $y = 0,0014 x + 0,0536$ (voir courbe d'étalonnage, annexe 05)



Photographie12: Dosage et lecture par spectrophotomètre des flavonoïdes.

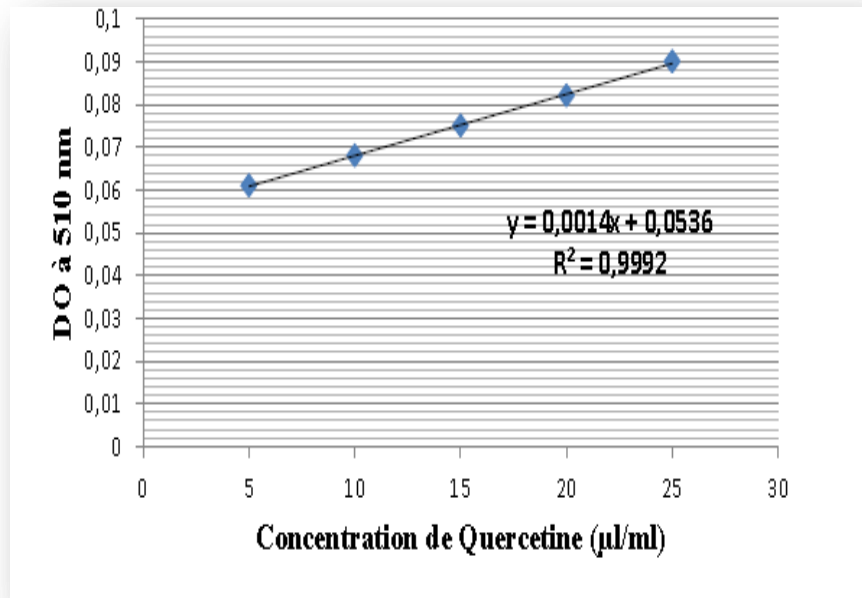


Figure 17 : courbe d'étalonnage de la quercétine.

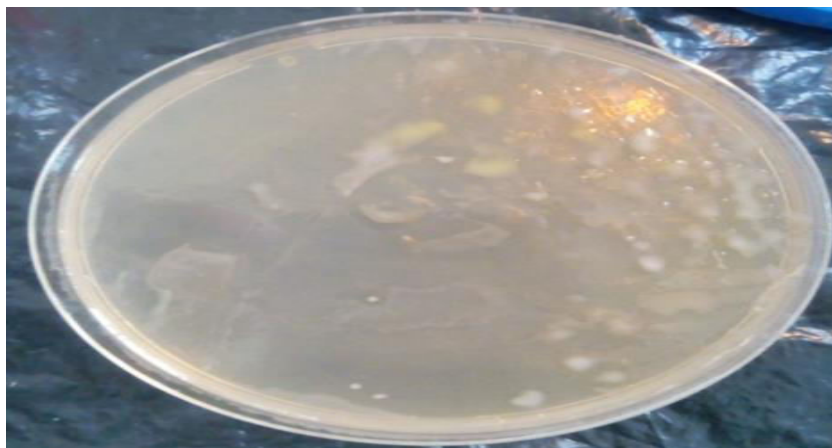
Les résultats obtenus des densités optiques (l'absorbance) après lecture sont extrapolé en moyenne de concentration des flavonoïdes à l'aide de la courbe d'étalonnage de la quercétine ainsi on pourra effectuer une comparaison des différentes concentrations de nos 04 variétés du pois chiche étudiés pendant les 04 phases de développement (végétatif, floraison, formation et remplissage des gousses et maturation) des 02 parties de la plante (racines et feuilles).

Résultats et discussion

IV Résultats et discussion

1 Observation des colonies

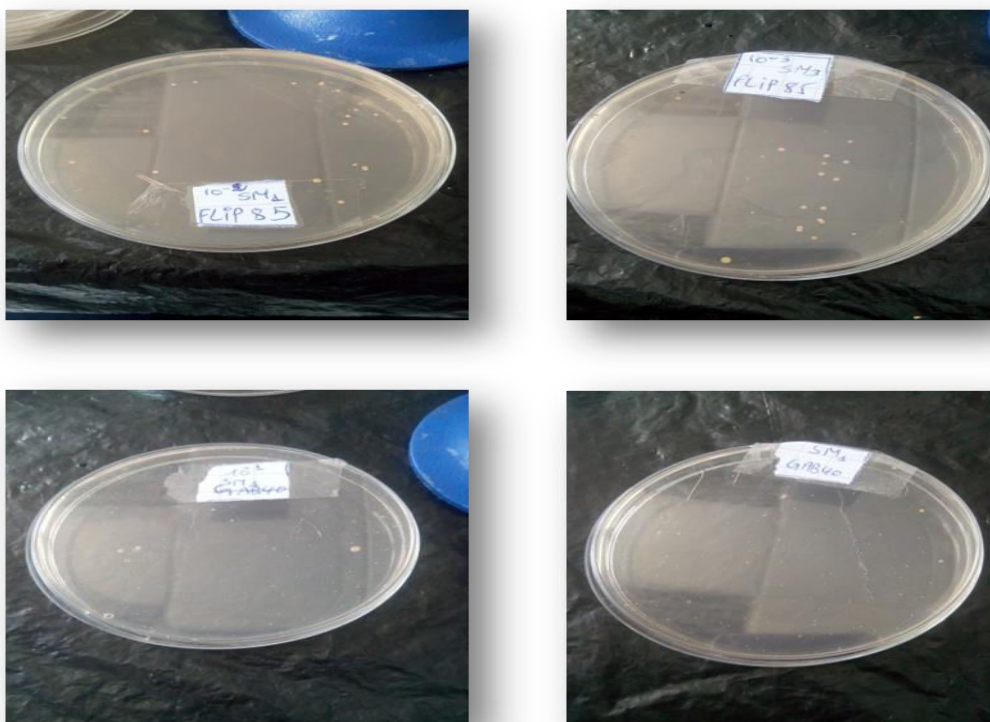
Les souches apparaissent au bout de 2 à 3 jours après incubation à 30°C. Elles ont une forme circulaire, convexe de 2 à 4 mm de diamètre.



Photographie 13 : L'observation des colonies après incubation à 30°C.

2 Observation des isolats de la dilution décimale

Après incubation à une température de 30°C pendant 2 à 3 jours s'effectue l'observation des différentes colonies.



Photographie 14: Observation des isolats de dilution décimale.

3 Dénombrement des souches bactériennes

Tableau 06: Dénombrement des souches bactériennes après dilutions décimales des 04 variétés de *cicer arietinum L.*

Concentration	Variétés			
	FLIP 85-55	FLIP 84-92	ILC 32-79	GAB 40
SM 1	150	106	1	103
10 ⁻¹	64	124	2	150
10 ⁻²	23	13	3	4
10 ⁻³	11	81	3	4
SM 2	4	100	3	105
10 ⁻¹	2	150	4	70
10 ⁻²	9	25	1	74
10 ⁻³	8	115	12	60
SM 3	4	27	111	133
10 ⁻¹	5	150	7	78
10 ⁻²	106	150	5	127
10 ⁻³	23	5	150	74

$$\text{UFC} = N / (V * F).$$

V = volume de dilution ; N = nombres de colonies ; F = facteur de dilution

Exemple

✓ **Flip 85-55 SM1**

Le nombre de bactéries= 180x 10 = 18x 10² UFC/ml.

✓ **FLIP 84-92 SM1 (10⁻¹)**

Le nombre de bactéries= 124x 10 x 10¹ = 124x 10² UFC /ml.

✓ **ILC 32-79 SM1 (10⁻²)**

Le nombre de bactéries= 3x 10 x 10² = 3x 10³ UFC /ml.

✓ **GAB 40 SM1 (10⁻³)**

Le nombre de bactéries= 4 x 10 x 10³ = 4x 10⁴ UFC /ml.

Le nombre de colonie est **très élevé** pour les 02 variétés russes **GAB 40, ILC 32-79** par rapport au 02 variétés syriennes **FLIP 84-92** , **FLIP 85-55**

Ce qui confirme l'activité symbiotique est très intense pour les **02** variétés russes **GAB 40, ILC 32-79** par ce que tous simplement il y a une activité symbiotique très important selon le nombre de bactéries.

4 Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées en utilisant la méthode des stries, puis incubées à 30C° afin d'obtenir des colonies isolées.



Photographie 15: Repiquage des souches bactériennes.

5 Teneur en flavonoïdes des différentes variétés de pois chiche

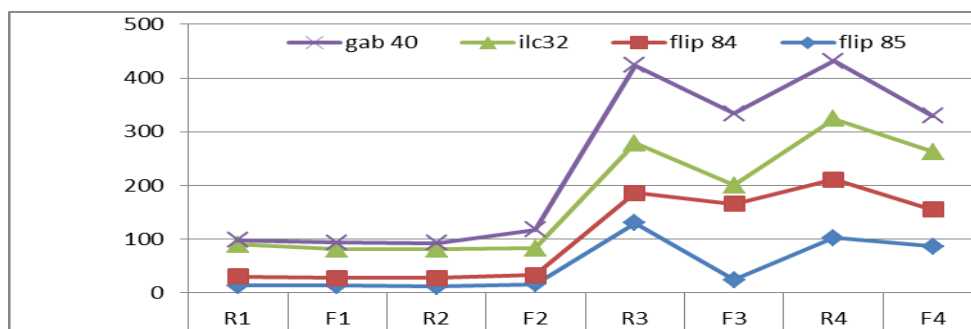


Figure 18 : Teneur en flavonoïdes des 04 variétés de pois chiche étudiées.

La quantité des flavonoïdes dans les différents extraits des 04 variétés du pois chiche étudiés. (Fig18) a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage établie à partir de solutions de différentes concentrations de quercitine (Fig 17). Les résultats obtenus sont exprimés en **milligrammes par gramme** de matière végétale en équivalent de la **quercitine**.

Les résultats illustrés dans la figure 18 montrent qu' au niveau **des racines** et durant les deux phases du développement de la plante (**formation et remplissage des gousses**) contiennent des concentrations importantes en flavonoïdes en ce qui concerne la variété **GAB 40** ($144,52 \pm 26,59$) durant la phase formation des gousses et ($106,90 \pm 4,75$) durant la phase remplissage des gousses , ensuite pour la variété **ILC 32-79** on a des concentrations en flavonoïdes de l'ordre de ($113,33 \pm 4,36$) durant la phase formation des gousses et ($92,38 \pm 8,58$) durant la phase remplissage des gousses (**voir annexe 06 tab 01**).

En troisième position en ce qui concerne la teneur en flavonoïde arrive les deux variétés le **FLIP 84** avec ($56,66 \pm 38,16$) durant la phase formation des gousses et ($108,80 \pm 10,00$) durant la phase remplissage des gousses.

En dernière position arrive la variété **FLIP 85** avec ($129,99 \pm 18,78$) durant la phase formation des gousses et ($102,38 \pm 27,44$) durant la phase remplissage des gousses.

De ce fait, nous pouvons classer selon un ordre décroissant les différentes variétés du pois chiche quant à leur concentration moyenne en flavonoïdes comme suit : **GAB 40 > ILC 32-79 > FLIP 84 > FLIP 85**.

6 Teneur en flavonoïdes au niveau des racines et des feuilles

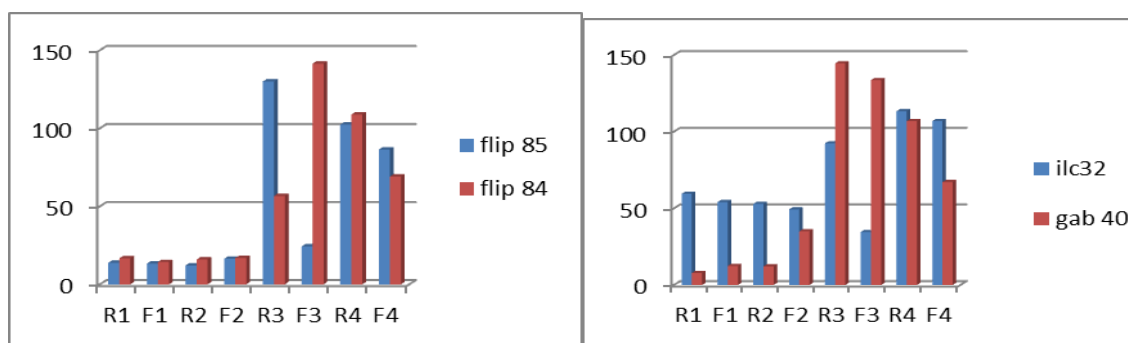


Figure 19 : Teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et des racines des 04 variétés de pois chiche étudiées.

Les résultats illustrés dans la figure 19 montrent que **les racines et les feuilles** durant les quatre phases de la croissance de la plante contiennent des concentrations plus au moins importantes en flavonoïdes.

Nous remarquons que la partie souterraine (les racines R) renferme une teneur en flavonoïdes nettement supérieure à celle de la partie aérienne (les feuilles F) surtout durant les 02 dernières phases c'est-à-dire la formation et le remplissage de gousses (R3 et R4)

La forte teneur en concentration est visible au stade formation des gousses pour la variété **GAB 40** ($144,52 \pm 26,59$) au niveau des racines par rapport ($133, 57 \pm 39, 67$) au niveau des feuilles de la même variété, pour la variété **ILC 32-79** on a constaté une concentration de l'ordre de ($92, 38 \pm 8,58$) au niveau des racines par rapport à une concentration de ($34,52 \pm 2,18$) au niveau des feuilles, en ce qui concerne les variété **FLIP 85** la teneur en flavonoïde est estimé a ($129,99 \pm 19, 68$) au niveau des racines contre une teneur de l'ordre de ($24,28 \pm 3,97$) dans la partie aérienne (les feuilles), pour la variété **FLIP 84** au niveau des racines la teneur est de ($108, 80 \pm 10,00$) contre ($86,42 \pm 44,58$) au niveau des feuilles au stage remplissage des gousses (**voir annexe 06 tab 02**).

Les flavonoïdes sont également présents dans l'extrait aqueux des deux parties de la plante et dans l'extrait de la partie souterraine en forte quantité.

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tout le contenu total en flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Lee KW et al., 2003**).

De ce fait, nous pouvons classer selon un ordre décroissant les différents organes de la plante selon leurs teneurs en flavonoïdes : racines >feuilles.

7 Teneur en flavonoïdes durant les stades de développement

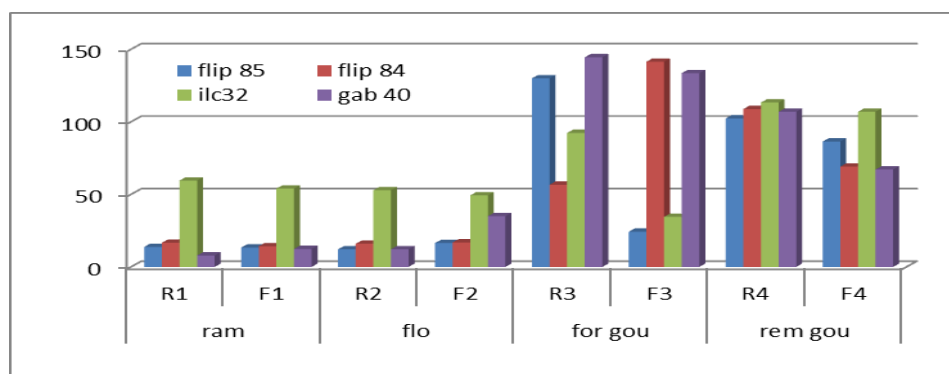


Figure 20: Teneur en flavonoïdes durant les différents stades de développement des 04 variétés de pois chiche étudiées.

Les résultats illustrés dans la figure 20 montrent que durant les quatre phases de la croissance de la plante les concentrations les plus importantes en flavonoïdes se trouvent au niveau des racines et durant la phase **formation des gousses** pour la variété **GAB 40** la teneur

en flavonoïde a atteint (**144, 52± 26,59**) ,et la phase **remplissage des gousses** pour la variété **ILC 32-79** pour une concentration de l'ordre de (**108,80 ± 10,00**) (**voir annexe 06 tab 03**).

Les concentrations des flavonoïdes au cours des deux premières phases du développement (**ramification et floraison**) est **très faibles** ne dépasse pas l'ordre de (**59,52 ± 52,99**) pour les 04 variétés étudiés, ce qui explique que durant la phase végétatif de la plante, il n'y a pas d'activité *Rhizobienne* du faite que la plante n'a pas encore secrété des métabolites secondaires surtout les flavonoïdes nécessaires pour attirés les *Rhizobiums* pour capter l'azote atmosphérique.

Les teneurs en flavonoïdes commencent à augmenter au fur et à mesure que la plante se développe et arrive au stade reproducteur c'est-à-dire vers la fin de **la floraison** et le début de **la formation des gousses** , ce qui explique le besoin de la plante à s'associer avec le rhizobium pour une relation symbiotique bénéfique pour les deux partenaires , et cela est apparent quant au nombre très élevés de nodules collecté des échantillons durant les dernières phase de la plante .

Les résultats des différents échantillons analysés révèlent la présence de métabolites secondaires comme les flavonoïdes en grande quantité dans les racines des différentes variétés étudiés surtout durant les dernières phases du développement de la plante c'est-à-dire pendant la formation et le remplissage des gousses.

L'analyse quantitative montre que les extraits issus des deux parties de la plante sont relativement riches en flavonoïdes avec des teneurs élevé ce qui explique que les flavonoïdes exudés par les racines induisent la synthèse de signaux de nodulation *Rhizobienne*, (**Foucher et al., 2000**).

Le nombre élevé des nodules récoltés dans les différents échantillons durant les deux dernières phases de développement de la plante concorde avec les teneurs élevé en flavonoïde au niveau des racines, ce qui explique une forte activité *Rhizobienne*, les *Rhizobiums* vont induire la formation de nodules au niveau racinaire du pois chiche (**Foucher et al., 2000**).

Ces nodules vont représenter de véritables organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes, pendant les deux dernière phases de la croissance de la plante et la nécessité et le besoin de cette dernière en azote pour son développement et pour la fructification (formation des graines) permettent cependant une augmentation de la croissance de la plante et de sa production (**Moulin et al., 2001**).

Les flavonoïdes qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, ils sont spécifiques des fabacées, la plante sécrète dans le sol des flavonoïdes qui sont perçus par le *Rhizobium* via une protéine régulatrice (NodD). Celle-ci déclenche l'expression des gènes nod (nod pour nodulation) aboutissant à la synthèse d'une molécule signal (**Guignard, 2000**).

Les *Rrhizobiums* vont induire la formation de nodules au niveau racinaire du pois chiche. Ces nodules vont représenter de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et les plantes. Cette symbiose à bénéfice réciproque va permettre aux bactéries de bénéficier d'un micro habitat exceptionnellement favorable ; les légumineuses leur procurant un apport en substrat carbonée issus de la photosynthèse, en échange les bactéries vont fixer et réduire l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes (**Moulin et al., 2001**).

8 Etude statistique

Tous les résultats de notre étude sont exprimés en moyenne de 03 essais (03 prélèvements) pour chaque mesure, ainsi que l'écart type de chaque valeur c'est-à-dire l'écart type des valeurs moyennes des concentrations des flavonoïdes.

Tous les résultats obtenus sont significatifs grâce à la L'ANOVA qui est un outil statistique il nous a permis d'appréhender les corrélations entre les différentes variétés étudiés et les concentrations en flavonoïdes.

Tableau 07 : Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H0 = Y = Moy(Y)$) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	3	6223,184	2074,395	0,789	0,503
Résidus	92	241879,033	2629,120		
Total	95	248102,217			

Conclusion

Conclusion

L'objectif de cette étude expérimentale consiste à déterminer l'impact de l'effet des métabolites secondaires en particulier les polyphénols et spécifiquement les flavonoïdes sur le développement de quatre variétés de pois chiche «*Cicer arietinum L.*», le rendement, et les effets sur le phénomène de nodulation et l'isolement des souches bactériennes du genre *Rhizobium*.

Le travail expérimental s'est déroulé dans la pépinière de Kais qui se situe à 20 Km de la Wilaya de Khenchla (culture en champs), campagne agricole 2015/2016.

L'expérimentation a porté sur quatre variétés de pois chiche **FLIP 85-55**, **FLIP 84-92**, **ILC 32-79** et **GAB 40** d'origine respectivement syrien et russe, cette dernière a été appliquée selon le modèle Split-Plot selon des unités expérimentales. La variété **GAB 40** et **ILC 32-79** ont donné de meilleurs résultats de germination et de croissance par rapport aux deux autres variétés le **FLIP 85-55**, **FLIP 84-92**, ce qui explique l'adaptation de cette variété aux différents facteurs écologiques du milieu (climat, sol... etc).

A travers l'analyse des résultats obtenus on peut conclure ce qui suit :

L'isolement des souches bactériennes du genre *Rhizobium* a montré un nombre important de colonies pour les 04 variétés étudiées, en particulier la variété **GAB 40** pour la solution mère 01 et des dilutions de l'ordre de 0.01 ml (**150 colonies**), le **FLIP 84-92** pour la solution mère 03 et des dilutions de l'ordre de 0.01 et 0.02 ml (**150 colonies**) et enfin **ILC 32-79** pour la solution mère 03 et des dilutions de l'ordre de 0.03 ml (**150 colonies**).

Les échantillons des isolats des souches bactériennes doivent être caractérisés pour mieux identifier les espèces nodulants la variété de pois chiche par excellence qui donne un meilleur rendement d'un point de vue agricole par l'inoculation.

L'analyse du dosage et l'extraction des flavonoïdes des 04 variétés étudiées ont montré que la forte teneur en concentration réside chez les deux variétés le **GAB 40** et **ILC 32-79** durant la phase reproductrice «stade de fructification», c'est-à-dire la phase formation et remplissage des gousses au niveau des racines (partie souterraine de la plante), ce qui confirme l'hypothèse que le phénomène de nodulation chez les légumineuses alimentaires, surtout le pois chiche, se manifeste lorsque il ya sécrétion des flavonoïdes en grande quantité au niveau des racines de la plante pour attirer les bactéries pour une relation symbiotique bénéfique pour les deux partenaires (plante/bactérie), ceci dans le but de capter de l'azote atmosphérique en grande quantité nécessaire à la plante pour son développement.

En perspective, l'identification des souches bactériennes nodulants les différentes variétés de pois chiche peuvent ouvrir des horizons pour la sélection des espèces du genre *Rhizobium* qui donnent de meilleurs rendements par inoculation en champs dans les buts économique et de sécurité alimentaire du pays.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1 **Adjei M.B., Quesenberry K.H., Chambliss C.G., (2002).** Nitrogen fixation and inoculation of forage legumes.
- 2 **Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikha l'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001).** Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid.
- 3 **Allali H et Boussouar K., (2007)**-Etude des besoins en eau de la culture de pois chiche (*Cicerarietinum*) dans la région de Sidi Bel Abbés mémoire de fin d'études De DES Biologie et physiologie végétale.
- 4 **Amarger, N. (1980).** Aspect microbiologique de la culture des légumineuses. Le Sélectionneur français. 28: 61-66.
- 5 **Ameziane .T.H (1994) .**Agronomie moderne .Hatier-aupelf –UREF ,544 .P
- 6 **Andrews M., Lea P.J., Raven J.A., Azevedo R.A., (2009).** Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. *Ann. Appl. Biol.*, 155, 1-13.
- 7 **Babayi H, Kolo I, Okogum JI (2004),** The anti microbial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri* 16 (2): 102 -5.
- 8 **Baize.D, Jabiol. B (1995).** Guide pour la description des sols .INR. Paris P.354.
- 9 **BEJIGA et VAN DER MAESEN L.J.G., (2007)**- *Cicer arietinum* L. In; Brink .M.
- 10 **Benson, D. R ., Clawson, M.L. (2000).** Evolution of the actinorhizal plant symbiosis. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation : a model system for analysis of a biological process*. Ch. 14. Triplett, E.W. (eds) Horizon scientific, Wymondhan Norfolk, England.
- 11 **Bouakaz, I., (2006).**Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.
- 12 **Brill.W.J(1977).** Biological nitrogen fixation .*Sci. Am* .236 :68.
- 13 **Catroux, G., A. Hartmann, C. Revellin (2001).** "Trends in rhizobial inoculant production and use." *Plant and Soil* 230(1): 21-30.
- 14 **Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., and Varma S.D. (1983).** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1995.
- 15 **Clakson. D.T (1985).** Factors affecting mineral nutrient acquisition .*Ann .Rev .Plant physiol.* 7 :77.
- 16 **Cuend M. 1999; Vermeris, (2006).** Recherche de nouveaux Composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *fagraeablumel* (Lloganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsiaalpina* (Scorphiariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula barbata* (Campanulaceae).Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'Université de Lausanne, p. 24.
- 17 **Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. (1992),** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 33: 5227-30.

- 18 **Dazzo F.B., (1995).** <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrr0101.html>
- 19 **Dixon, R. O. D. and C. T., Wheeler 1986.** Nitrogen fixation in plants. Blackie. Glasgow. 152P.
- 20 **Djordjevic, M. A. (2004).** "Sinorhizobium meliloti metabolism in the root nodule : A proteomic perspective." *Proteomics* 4(7): 1859-1872.
- 21 **Dommergues, Y.; Duhaux, E et G. D. Hoang (1999).** Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (ed.). Édition espaces 34. Paris. 475 p.
- 22 **Drevon J.J, Hinsinger P (2004).** Nutrition phosphate et réponse des plantes et de la symbiose rhizobienne à la déficience en phosphore.
- 23 **Duc. J.A (2010).** Manuel des légumineuses d'importance économique du monde pression d'espace, New York.P.52-57
- 24 **Effendi L., Yajun Y. et al., (2008).** Functional expression of a P450 hydroxylase for the biosynthesis of plant – specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* .*Metab.Eng.*8:172-181.
- 25 **El Bekkay B., (1984),** Etudes de souches de rhizobium du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Agriculture*, 3, 217-330.
- 26 **Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M. (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, Review. *Phytochemistry* 68, 939- 953.
- 27 **Epstein, E. (1972).** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley, New York.
- 28 **FAO, Mars (2010).** Site de la FAO : www.fao.org.
- 29 **Ferrari, (2002) Ferrari J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolite secondaire des thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle : Gnidia in volucrata Steud. A. Rich. Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.
- 30 **Gage, DJ. (2004)** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol MolBiol Rev* 68(2):280-300.
- 31 **Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., and Lanzotti V. (2008).** Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry. letters.* 1: 44-48.
- 32 **Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005)** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228–1235.
- 33 **Ghestem A, Seguin E, Paris M and Orecchioni A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris.; 275.
- 34 **Gillet.K.E (2001).** Nitrogen fixation in tropical cropping systems 2^{er} ED. CAB. International walling Ford. ISBN: 0859472.P.423.

- 35 Gridley H., (1985),** Food legumes in Tunisia: status and improvement. In: amélioration des légumineuses alimentaires. Synthèse des travaux de stage de formation ICARDA, 41-42.
- 36 Hagerman AE.** Chemistry of tannin-protein complexation in chemistry and significance of tannins. In R. W. Hemingway RW, Karchesy JJ. Chemistry and significance of condensed tannins. Ed. Plenum Press, New York, **1998**, 323-33.
- 37 Harborne, J. B. et Williams C. A. (2001).** "Anthocyanins and other flavonoids." Natural Product Reports 18 (3): 310-333.
- 38 Hartmann T. (2007).** From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry. 68 :2831-2846.
- 39 Heller W, Forkmann G.** The flavonoids. Advances in research since 1993. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425.
- 40 Hopkins W.G., (2003).** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de Boeck.
- 41 https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Dénombrement_microbiologique_sur_milieu_solide&oldid=134560271**
- 42 Hulse. J.H (1991).** Nature, composition et utilisation des légumineuses de grain P.11-27. Dans : utilisations des légumineuses tropicales.
- 43 I.T.G.C El Khroub**
- 44 ITGC, 2001 :** Institut Technique des Grandes Cultures, La Culture du Pois chiche (*Cicer arietinum*).
- 45 ITGC, 2003 :** Institut Technique des Grandes Cultures, La Culture du Pois chiche (*Cicer arietinum*).
- 46 ITGC, 2011 :** Institut Technique des Grandes Cultures, La Culture du Pois chiche (*Cicer arietinum*).
- 47 ITGC, 2013 :** Institut Technique des Grandes Cultures, La Culture du Pois chiche (*Cicer arietinum*), Exigences climatiques.
- 48 Jana TI. A et schluter K (1977) -** Lutte contre l'anthracnose du pois chiche Le Maroc Agricole. 91. PP 22-25.
- 49 Jean .D (1973) .**Eléments d'écologie et d'agronomie .Tom II : Exploitation et amélioration du milieu Bases d'une nutrition efficace végétale. Editions .J-B .BAILLIERE .P : 250-497. 197-262.
- 50 Jordan D C (1984) .**Family III .Rhizobiaceae Conn 1938. p .234-254 .In : N.R .Kreig and J H. Holt (ed) . Bergey's manual of systematic bacteriology .vol 1. The Williams & Wilkins Co .Baltimore.
- 51 Juergen. P and Philip. P (2006).** Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. School of Biological Sciences, University of Reading, UK, RG6 6AJ.
- 52 Kim DO, Chun. OK, Kim YJ, et al (2003)** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J Agricult Food Chemistr 22 :6509-15

- 53 Kloepper, J.W., et Schroth, M.N. (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. -Dans Proceedings of the 4th International Conférence on Plant Pathogenic Bacteria. Vol. 2. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Angers, France. pp. 879–882.
- 54 Kramer P.J., (1983).** Water relations of plants. New York, USA: ICRISAT, Academic PressInc.
- 55 Labdi M., Irekti H., Ouzzane A.H., Zine CIHEAM-(1990)** Options Méditerranéennes-Série Séminaires- n°9 : 137-140.
- 56 Ladizinsky. G (1975).** Un nouveau cicer de Turquie. Notes de jardin botanique royal. Edimbourg 34 : 201-202.
- 57 Layzell, D. B (1990).** N₂ fixation, NO₃⁻ reduction and NH₄ assimilation. In: Plant physiology, biochemistry and molecular biology. D. T. Denis and D. H. Turpin(Eds), Longman Scientific & Technical, Singapore, 389-413.
- 58 Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003)** Cocoa has more Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J Agric Food Chem 51:7292–5
- 59 Lerouge P, Roche, Faucher C, et al. (1990)** Symbiotic host specificity of Rhizobium melilotiisdetermined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature; 344 : 781-4.
- 60 Lhuillier, A. (2007).**Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : Agauriasalicifolia Hook. f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa - trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae).Thèse de doctorat.
- 61 Lindstrom, K., M. Murwira, A. Willems, N. Altier (2010).** "The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia." Research in Microbiology 161(6): 453-463.
- 62 Lozet .J, Mathieu. C (2002).** Analyse chimique des sols, méthodes choisies. Clement M et Françoise P016 : 292.
- 63 Luce MS, Whalen JK, Ziadi N, Zebarth BJ (2011)** Nitrogen Dynamics and Indices to PredictSoil Nitrogen Supply in Humid Temperate Soils. Chaptertwo in Advances In Agronomy: 55 -88.
- 64 Macheix J-J ., Fleuriet A. et Sarni Monchado., (2005).** Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : Les polyphénols en agro-alimentaire, Cheynier V., SarniMonchado P. Lavoisier, Paris : 510 P
- 65 Macheix, J. J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes.
- 66 Maheri-N., Mohammad Chamani1, (2008).** Ali-Asghar Sadeghi1, Ali Mirza-Aghazadeh and Abolfazl Aghajanzadeh- Golshani.
- 67 Mahmoud N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., and Hay A.J. (1993).** Inhibition of HIV infection by flavanoids. Antivir.Res. 46(7): 1257-71.

- 68 Medic- Saric M, Jasprica I, Smolcic Bubalo A, and Momar A. (2003).** Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta.* (cited in **Mohammedi Z, 2005**) ; 77(1-2):361-6.
- 69 Middleton and Elliott J. (1996).** Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34 (5): 344-348.
- 70 Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat. Strasbourg.
- 71 Modak B.** Actividad antibacteriana de flavonoides aislados des exuda doresinos de
- 72 Mookerjee B.K., Lee T.P., Logue G.P., Lippes H.A., and Middleton E. (1986).** The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* 213: 511-20.
- 73 Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin –Masson C (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta –subclass of proteobacteria. *Nature* 411, 948-950.
- 74 Munier-Jolain N.G., Salon C., (2005).** Are the carbon costs of seed production related to the quantitative and qualitative performance? An appraisal for legumes and other crops. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1388-1395.
- 75 Munive J.V. 2002.** Diversité génétique de souche de *Bradyrhizobium* d'arbres de forêts tropicales humides en Guyane, en Guinée et à Madagascar. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I, 147p.
- 76 Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., and Kim H.P. (1994).** Effects of natural lyoccurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54 (5):313-20.
- 77 Neupert W, Schatz (1981).** How proteins are transported into mitochondria. *TIBS.* 6:1.
- 78 Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO.** Antimicrobial potentials of (UDA) **Xylopi** (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal. *Phytochemistry. letters.* 1 :44-48.
- 79 Olsen.S.R et Sommers. C. E (1982).** Phosphorus in Methods of soil Analysis, Part 2 Chemical and Microbiological Properties, Sec. édition. Page 403-430.
- 80 Ong K.C., and Khoo H.E. (2000).** Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* 67:1695-1705.
- 81 Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., --Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K. (2005).** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* 15, 531-535.
- 82 Patricaria E J, Taté R, Ferraili S et Laccarino M (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev. Cytol.* 234: 201-262.
- 83 Pelmont J., (2005).** Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.
- 84 Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I.J., Alves S., Urquiaga S., Boddey R.M., Dakora F.D., Bhattarai S., Maskey S.L., Sampet C., Rerkasem B., Khan**

- D.F., Haug-gaard-Nielsen H., Jensen E.S., (2009).** The contribution of nitrogen-fixing croplegumes to the productivity of agricultural systems. *Sym-biosis*, 48, 1-17.
- 85 Plantes et botanique, (2014).** http://www.plantes-botanique.org/biologie_04_0_le-systeme-racinaire. rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 37 (3-4): 329-33.
- 86 Robert D et Catesson. A. M (1999).** *Biologie végétale .Vol 1 .Organisation cellulaire .Paris .Doinn.*
- 87 Robson RL, Postgate JR, (1980).** Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review of Microbiology*34 : 183-207.
- 88 Rosenberg C., (1997).** Signaux symbiotiques chez *Rhizobium*. In : *Assimilation de l'azote chez les plantes (Morot-Gaudry J.F., ed.)*, Inra, pp. 149-162.
- 89 Saccardo F. & Calcagno F., (1990).** Consideration of chick pea plant ideo types for spring and wintersawing. *CIHEAM, Options Méditerranéennes, Séries Séminaires.*
- 90 Sarni - Manchado P, Cheyner V. (2006),** *Les polyphénols en agroalimentaire*, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 300 -398.
- 91 Saxena –MC (1987)** Agronomy of chickpea in the chick pea ICARDA PP 207 -232.
- 92 Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073-2085.
- 93 Schlessinger W.H., (2009).** On the fate of anthropogenic nitrogen. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 203-208. Seddas P., Gianinazzi-Pearson V., Schoefs B., Küster H., Wipf D., 2009. Communication and signaling in the plant-fungus symbiosis : the mycorrhiza. In F. Baluska (ed) *Plant - Environment Interactions*, Signaling and communication in plants, pp 45-71. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 94 Shah V.K, Ugale R.A, Imperial J, Brill W.J (1984).** Molybdenum in nitrogenase. *Ann.Rev.Biochemi.*53:263.
- 95 Shanmmugam K.T, O’Gara F, Anderson K, Valentine R.C (1997).** Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plantphysiol*, 29: 263-276.
- 96 Singleton P.M., Ben Bohloul B. (1984),** Effect of salinity on nodule formation by soybean, *Plant Physiol.* 74 72–76.
- 97 Smil, V. (2002).** Bio fixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In : *Nitrogen fixation: global perspectives.* T.M. Brogan et al. ed., CAB International, New York, 7-9.
- 98 Somasegaran P., Hoben H.J. (1994).** *Handbook for Rhizobia : Methods in legume-Rhizobia technology.*
- 99 Spedding G, Ratty A, Middleton E. (1989),** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 12 (2): 99
- 100 Stevenson, J. F (1986).** *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients.* John Wiley & Sons, New York.
- 101 Sutton M.A., Bleeker A., Howard C.M., Bekunda M., Grizzetti B., de Vries W., van Grinsven H.J.M., Abrol Y.P., Adhya T.K., Billen G., Davidson E.A, Datta A., Diaz R., Erisman J.W., Liu X.J., Oenema O., Palm C., Raghu- ram N., Reis S., Scholz R.W., Sims T., Wes- thoek H., Zhang F.S., with contributions from Ayyappan S., Bouwman A.F.,**

Bustamante M., Fowler D., Galloway J.N., Gavito M.E., Garnier J., Greenwood S., Hellums D.T., Holland M., Hoysall C., Jaramillo V.J., Klimont Z., Ometto J.P., Pathak H., PloqFichelet V., Powlson D., Ramakrishna K., Roy A., Sanders K., Sharma C., Singh B., Singh U., Yan X.Y., Zhang Y., 2013.

102 Thiébeau P., Lô-Pelzer E., Klumpp K. et al., 2011. Conduite des légumineuses pour améliorer l'efficacité énergétique et réduire les émissions de gaz à effet de serre à l'échelle de la culture et de l'exploitation agricole. *Innovations agronomiques*, 11, 45-58.

103 Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 2006, 184 (5): 27-8.

104 Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, et al (2000) Leaf flavonoids as systematic characters in the Genera *lavandula* and *sabaudia*. *Biochem Syst Ecol* 2 :991-15

105 Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, et al (2000) Leaf flavonoids as systematic characters in the Genera *lavandula* and *sabaudia*. *Biochem Syst Ecol* 2 :991-1007.

106 USDA., (2008) - Plant profile of *Cicer arietinum* (Chickpea). United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS), Plant database.

107 Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, and Swings J (1996). Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacteriol Systematic .*Microbiological .Rev* .60(2), 407-438.

108 Van Der Measen .L.J.G (1972).*Cicer L .une monographie genre, de son écologie et culture.*

109 Van Der Measen. L.J.G (1987).Origine, histoire et taxonomie du cicer L du pois chiche .p.11-34 dans: Saxena .M.C; Singh E.D, le pois chiche.

110 Vincent J.M. (1970)- A manual for the practical study of the root nodule bacteria .IBP. Handbook n°15_ Blackwell scientific publishers. Oxford.

111 Waksman. S. A (1936) .Humus, origin, chemical composition and importance in nature, Baillière, Tindall and Cox, London.

112 William G. Hopkins, (2003). Physiologie végétale, traduction de la 2^e édition américaine par S. Rambour, révision scientifique de Ch-M Evrard, De Boeck et Larciens. a.

113 Yao K., De Luca V. and Brisson N. (1995). Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.*; 7: 1787-1799.

114 Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet - Marel J C, Gillis M, Dreyfus B, et de Lajudie P (2004). Characterization of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3) : 380-395.

Annexes

Titre : Isolement et caractérisation des *Rhizobium* nodulant le pois chiche

Résumé

Cette étude porte sur une expérimentation faite sur 04 variétés de pois chiche **GAB40, ILC 32-79, FLIP 85-55, FLIP 84-92** cultivé au niveau de la pépinière de Kais wilaya de Khenchla, cette étude a montré que des teneurs en polyphénols (Flavonoïdes) sont très importantes au niveau des racines des 04 variétés durant les 02 phases de développement de la plante (Formation et remplissage des gousses). Surtout pour les 02 variétés **GAB 40 et ILC 32-79** (Activité symbiotique).

L'isolement des bactéries du genre *Rhizobium* nodulant les 04 variétés du pois chiche peuvent être identifiés et caractérisés pour l'inoculation du pois chiche par les souches bactérienne donnant un meilleur rendement agricole et permettant de réduire l'utilisation des fertilisants azotés et le recyclage de l'azote dans les sols agricoles.

Mots clés : Pois chiche, *Rhizobium*, Isolement, Flavonoïde.

Title : Isolation and caractérisation of *Rhizobia* nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Abstract

This study is based on experimentation with 04 varieties of chickpea **GAB40, ILC 32-79, FLIP 85-55, FLIP 84-92** cultivated at the nursery of Kais wilaya of Khenchla, This study showed that polyphenol contents (Flavonoids) are very important in the roots of the 04 varieties during the 02 phases of development of the plant (formation and filling of the pods). Especially for the 02 varieties **GAB 40 and ILC 32-79** (Symbiotic activity).

The isolation of *Rhizobium* bacteria nodulating the 04 varieties of chickpea can be identified and characterized for the inoculation of chickpea by bacterial strains giving a better agricultural yield and reducing the use of nitrogenous fertilizers and the recycling of Nitrogen in agricultural soils.

Key words: Chickpea, *Rhizobium*, Isolation, Flavonoid.

عنوان : عزل و وصف ريزوبيا الحمص العقيدية

ملخص

تعتمد هذه الدراسة على تجربة زراعة 04 أنواع من الحمص **FLIP 85, ILC 84, IPLF 32-BAG, 79 40** على مستوى مشتل قاييس ولاية خنشلة، بينت الدراسة أن مستوى البوليفينول و خاصة الفلافونويد عال جدا على مستوى جذور أصناف الحمص خاصة صنف **GAB40 و ILC32-79** عند مرحلة النمو (تكوين الفلقات و امتلاء الفلقات).

ان عزل البكتيريا (الريزوبيوم) الذي يتكون بجذور الأصناف الأربعة من الحمص نستطيع تعريف و تحديد البكتيريا التي تستعمل في التطعيم و هذا لتحسين المردودية الفلاحية و للتقليص من الاستعمال المفرط للأسمدة الأزوتية و تدوير الأزوت في الأتربة الفلاحية.

الكلمات المفتاحية: الحمص, الريزوبيوم, العزل, الفلافونويد.

Annexe 1 : Matériel et Produits chimiques

Matériels

Autoclave, Bain marine, Balance, Bec bunsen, Boite de pétri en plastique, Boite de pétri en vert, Broyeur, Centrifugeuse, Compteur des colonies, Entonnoir, Étuve, Hôte, Les ambons, Micro pipette, pipette, Anse de platine, Papier filtre, Pence, Plaque chauffante, Portoir, Spatule Spectrophotométrie, Stérilisateur, Tube à essai, Vortex, Réfrigérateur, flacon, bécher, barreau magnétique, Incubateur

Produits chimiques

Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), Eau de javel, Eau distille, Eau physiologique, Ethanol, chlorure de mercure ($HgCl_2$), Hydroxyde de sodium ($NaOH$), Matériel végétale poudre, Méthanol, Milieu de culture (YMA), Nodules, Rouge Congo, Chlorure de Calcium ($Ca Cl_2$), Nitrite de sodium ($NaNO_2$)



Les produits chimiques utilisés



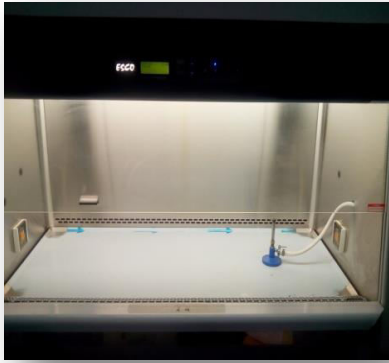
Autoclave



L'étuve



Spectrophotomètre



La hotte



Vortex



Centrifugeuse



Balance

Annexe 2 : Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g /l :

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrait de levure	0,5
Agar	20
Eau distillée	1L
pH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.



Le milieu de culture YMA.

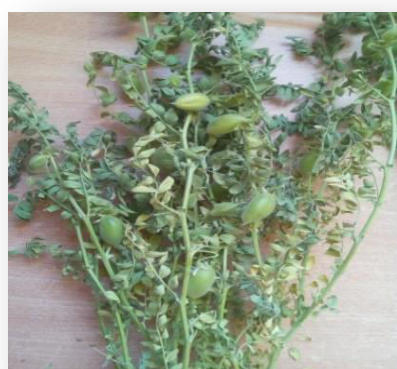
Annexe 3: La plante étudiée (*Cicer arietinum*) dans les 04 phases de développement



Germination



Floraison



Formation des gousses



Remplissage des gousses

Annexe 4

Tableau 1 : Tableau pour la dilution de méthanol et éthanol.

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Annexe 5 : Tableau de multi -critère

		FLIP 85-55				
		Répétitions	DO	Concentration	Moyenne	Ecart type
Ramification	Racine R1	Premier Répétition	0,008	5,71	13,81	10
		deuxième Répétition	0,015	10,71		
		troisième Répétition	0,035	25		
Ramification	Feuille F1	Premier Répétition	0,021	15	13,33	4,19
		Deuxième Répétition	0,023	16,43		
		Troisième Répétition	0,012	8,57		
Floraison	Racine R2	Premier Répétition	0,016	11,43	12,14	3,27
		Deuxième Répétition	0,013	9,29		
		Troisième Répétition	0,022	15,71		
Floraison	Feuille F2	Premier Répétition	0,021	15	16,43	1,43
		Deuxième Répétition	0,023	16,43		
		Troisième Répétition	0,025	17,86		
Formation des gousses	Racine R3	Premier Répétition	0,219	156,43	129,99	18,69
		Deuxième Répétition	0,145	103,57		
		Troisième Répétition	0,183	130,71		
Formation des gousses	Feuille F3	Premier Répétition	0,028	20	24,29	3,98
		Deuxième Répétition	0,035	25		
		Troisième Répétition	0,039	27,86		
Remplissage des gousses	Racine R4	Premier Répétition	0,164	117,14	102,38	27,44
		Deuxième Répétition	0,167	119,29		
		Troisième Répétition	0,099	70,71		
Remplissage des gousses	Feuille F4	Premier Répétition	0,149	35	86,43	44,59
		Deuxième Répétition	0,160	114,29		
		Troisième Répétition	0,154	110		

Les phases de développement	Partie de la plante	Répétitions	FLIP 84-92		Moyenne	Ecart type
			DO	Concentration		
Floraison	Racine R1	Premier Répétition	0,019	13,571	16,67	5,36
		deuxième Répétition	0,019	13,571		
		troisième Répétition	0,032	22,857		
	Feuille F1	Premier Répétition	0,03	21,428	14,29	7,95
		Deuxième Répétition	0,022	15,714		
		Troisième Répétition	0,008	5,714		
Formation des gosses	Racine R2	Premier Répétition	0,011	7,857	15,95	7,01
		Deuxième Répétition	0,028	20		
		Troisième Répétition	0,028	20		
	Feuille F2	Premier Répétition	0,039	27,857	16,90	11,87
		Deuxième Répétition	0,026	18,571		
		Troisième Répétition	0,006	4,285		
Remplissage des gosses	Racine R3	Premier Répétition	0,05	35,714	56,67	38,16
		Deuxième Répétition	0,141	100,714		
		Troisième Répétition	0,047	33,571		
	Feuille F3	Premier Répétition	0,222	158,571	141,43	35,40
		Deuxième Répétition	0,141	100,714		
		Troisième Répétition	0,231	165		
Remplissage des gosses	Racine R4	Premier Répétition	0,153	109,285	108,80	10
		Deuxième Répétition	0,138	98,571		
		Troisième Répétition	0,166	118,571		
	Feuille F4	Premier Répétition	0,133	95	69,09	60,32
		Deuxième Répétition	0,157	112,142		
		Troisième Répétition	0,111	0,151		

		Répétitions	ILC 32-79			Ecart type
			DO	Concentration	Moyenne	
Ramification	Racine R1	Premier Répétition	0,164	117,14	59,52	52,99
		deuxième Répétition	0,018	12,86		
		troisième Répétition	0,068	48,57		
	Feuille F1	Premier Répétition	0,158	112,86	54,05	51,97
		Deuxième Répétition	0,049	35		
		Troisième Répétition	0,02	14,29		
Floraison	Racine R2	Premier Répétition	0,187	133,57	52,86	69,92
		Deuxième Répétition	0,02	14,28		
		Troisième Répétition	0,015	10,71		
	Feuille F2	Premier Répétition	0,158	112,86	49,29	55,07
		Deuxième Répétition	0,026	18,57		
		Troisième Répétition	0,023	16,49		
Formation des gosses	Racine R3	Premier Répétition	0,141	100,71	92,38	8,58
		Deuxième Répétition	0,13	92,86		
		Troisième Répétition	0,117	83,57		
	Feuille F3	Premier Répétition	0,045	32,14	34,52	2,18
		Deuxième Répétition	0,049	35		
		Troisième Répétition	0,051	36,43		
Remplissage des gosses	Racine R4	Premier Répétition	0,16	114,29	113,33	4,36
		Deuxième Répétition	0,164	117,14		
		Troisième Répétition	0,152	108,57		
	Feuille F4	Premier Répétition	0,142	101,43	106,90	5,068
		Deuxième Répétition	0,156	111,43		
		Troisième Répétition	0,151	107,86		

		Répétitions	GAB 40			Ecart type
			DO	Concentration	Moyenne	
Ramification	Racine R1	Premier Répétition	0,015	10,714	7,86	2,86
		deuxième Répétition	0,011	7,857		
		troisième Répétition	0,007	5		
	Feuille F1	Premier Répétition	0,008	5,714	12,38	8,64
		Deuxième Répétition	0,013	9,285		
		Troisième Répétition	0,031	22,142		
Floraison	Racine R2	Premier Répétition	0,016	11,428	12,14	6,11
		Deuxième Répétition	0,009	6,428		
		Troisième Répétition	0,026	18,571		
	Feuille F2	Premier Répétition	0,027	19,285	34,99	32,29
		Deuxième Répétition	0,019	13,571		
		Troisième Répétition	0,101	72,142		
Formation des gousses	Racine R3	Premier Répétition	0,230	164,285	144,52	26,59
		Deuxième Répétition	0,217	155		
		Troisième Répétition	0,168	114,285		
	Feuille F3	Premier Répétition	0,215	153,571	133,57	39,69
		Deuxième Répétition	0,223	159,285		
		Troisième Répétition	0,123	87,857		
Remplissage des gousses	Racine R4	Premier Répétition	0,148	105,714	106,90	4,76
		Deuxième Répétition	0,157	112,142		
		Troisième Répétition	0,144	102,857		
	Feuille F4	Premier Répétition	0,065	46,428	67,14	33,43
		Deuxième Répétition	0,069	49,285		
		Troisième Répétition	0,148	105,714		

Annexe 6

Tableau 1 : Teneur en flavonoïdes des 04 variétés de pois chiche étudiées.

Phases	Parties	FLIP 84-92	FLIP 85-55	GAB 40	ILC 32-79
Ramification	Racine	16,66 ± 5,36	13,8 ± 10,00	7,85 ± 2,85	59,5 ± 52,99
	Feuille	14,28 ± 7,95	13,33 ± 4,18	12,38 ± 8,64	54,04 ± 51,9
Floraison	Racine	15,95 ± 7,01	12,14 ± 3,27	12,14 ± 6,10	52,8 ± 69,92
	Feuille	16,9 ± 11,87	16,42 ± 1,42	34,99 ± 32,29	49,2 ± 55,06
Formation des gousses	Racine	56,6 ± 38,16	130 ± 18,68	144,5 ± 26,59	32,38 ± 8,58
	Feuille	141,4 ± 35,4	24,28 ± 9,97	133,5 ± 39,69	34,52 ± 2,18
Remplissage des gousses	Racine	108,8 ± 10,0	102,3 ± 27,4	106,90 ± 4,75	113,3 ± 4,36
	Feuille	69,09 ± 60,3	86,4 ± 44,59	67,14 ± 33,43	106,90 ± 5,06

Tableau 2 : Teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et des racines de variétés FLIP 85-55 et FLIP 84-92.

Phases	Parties	FLIP 85-55	FLIP 84-92
Ramification	Racine	13,809 ± 10,00	16,666 ± 5,36
	Feuille	13,33 ± 4,18	14,285 ± 7,95
Floraison	Racine	12,142 ± 3,27	15,952 ± 7,01
	Feuille	16,428 ± 1,42	16,904 ± 11,87
Formation des gousses	Racine	129 ± 18,68	56,666 ± 38,16
	Feuille	24,286 ± 9,97	141,43 ± 35,40
Remplissage des gousses	Racine	102,38 ± 27,44	108,81 ± 10,00
	Feuille	86,428 ± 44,59	69,098 ± 60,32

Tableau 2 : Teneur en flavonoïdes au niveau des feuilles et des racines de variétés **ILC 32-79** et **GAB 40**.

Stade de développement	Parties de la plante	ILC 32-79	GAB 40
Ramification	Racine	59,52 ± 52,99	7,85 ± 2,85
	Feuille	54,04 ± 51,97	12,38 ± 8,64
Floraison	Racine	52,85 ± 69,92	12,14 ± 6,10
	Feuille	49,28 ± 55,06	34,99 ± 32,29
Formation des gousses	Racine	92,38 ± 8,58	144,52 ± 26,59
	Feuille	34,52 ± 2,18	133,57 ± 39,69
Remplissage des gousses	Racine	113,33 ± 4,36	106,90 ± 4,75
	Feuille	106,90 ± 5,06	67,14 ± 33,43

Tableau3 : Teneur en flavonoïdes durant les différents stades de développement des 04 variétés de pois chiche étudiés.

Phases	Parties	FLIP 85-55	FLIP 84-92	ILC 32-79	GAB 40
Ramification	Racine	13,80 ± 10	16,666 ± 5,36	59,523 ± 52,99	7,857 ± 2,85
	Feuille	13,33 ± 4,18	14,285 ± 7,95	54,047 ± 51,97	12,38 ± 8,64
Floraison	Racine	12,14 ± 3,27	15,952 ± 7,01	52,856 ± 69,92	12,14 ± 6,10
	Feuille	16,42 ± 1,42	16,90 ± 11,87	49,285 ± 55,06	34,99 ± 32,2
Formation des gousses	Racine	130 ± 18,6	56,66 ± 38,16	32,38 ± 8,58	144,5 ± 26,5
	Feuille	24,28 ± 9,97	141,4 ± 35,40	34,523 ± 2,18	133,5 ± 39,6
Remplissage des gousses	Racine	102,3 ± 27,4	108,8 ± 10,00	113,333 ± 4,36	106,90 ± 4,7
	Feuille	86,42 ± 44,5	69,09 ± 60,32	106,904 ± 5,06	67,14 ± 33,4